

UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Ecole Doctorale : Sciences des Procédés - Sciences des Aliments

Discipline : Biotechnologie, Microbiologie

Présentée et soutenue publiquement

par

Noël DURAND

Le 5 décembre 2012

**Dynamique des populations microbiennes au cours du
traitement post récolte du café et relations
interspécifiques entre souches ochratoxinogènes**

Jury

Florence Mathieu	Professeur ENSAT Toulouse	Rapporteur
Sevastianos Roussos	Directeur de recherche IRD Marseille	Rapporteur
Amaury Martinez	Professeur Université Centrale Venezuela	Examineur
Angélique Fontana	Maître de conférences UM2	Examineur
Sabine Galindo	Professeur UM2	Directrice de thèse
Didier Montet	Docteur HDR CIRAD	Directeur de thèse
Bernard Guyot	CIRAD	Invité

UNIVERSITE MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE MONTPELLIER II

Ecole Doctorale : Sciences des Procédés - Sciences des Aliments

Discipline : Biotechnologie, Microbiologie

Présentée et soutenue publiquement

par

Noël DURAND

Le 5 décembre 2012

**Dynamique des populations microbiennes au cours du
traitement post récolte du café et relations interspécifiques
entre souches ochratoxinogènes**

Jury

Florence Mathieu	Professeur ENSAT Toulouse	Rapporteur
Sevastianos Roussos	Directeur de recherche IRD Marseille	Rapporteur
Amaury Martinez	Professeur Université Centrale Venezuela	Examineur
Angélique Fontana	Maître de conférences UM2	Examineur
Sabine Galindo	Professeur UM2	Directrice de thèse
Didier Montet	Docteur HDR CIRAD	Directeur de thèse
Bernard Guyot	CIRAD	Invité

A mes grands parents

A mes parents

A ma femme et mes enfants

Remerciements

Je tiens avant tout à remercier, le CIRAD ainsi que les différents responsables de programmes ou d'unités, je pense notamment à Christophe Montagnon, André Rouzière et Max Reynes. Ils m'ont permis, dans le cadre de la formation continue, cette évolution de carrière de Technicien Supérieur à Docteur en sciences des aliments, ceci en 10 ans.

Je remercie Madame Florence Mathieu, Professeur à l'ENSAT de Toulouse d'avoir accepté de participer à ce jury et de juger ce travail en tant que rapporteur.

Je remercie Monsieur Sevastianos Roussos, Directeur de Recherche à l'IRD d'avoir accepté de participer à ce jury et de juger ce travail en tant que rapporteur, mais aussi président du jury.

Je remercie Monsieur Amaury Martinez, professeur à l'UCB d'avoir accepté de participer à ce jury et de juger ce travail en tant qu'examineur.

Je voudrais aussi remercier les personnes qui m'ont directement aidé dans mes travaux de thèse, comme Dominique, Jean Claude, Isabelle et Jean Christophe. Je n'oublierais pas les personnes qui m'ont aidé sur les autres activités de recherche et d'analyses, ce qui m'a laissé plus de temps pour mes travaux de thèse, je pense à Laurent, Renaud, Philippe et Philip, mais aussi Nathalie et Chantal.

Je remercie aussi Oscar et Mirna, pour leur aide en ce qui concerne les échantillons de café du Mexique ainsi que les souches d'aspergillus isolées du café, et Mirna pour les travaux sur la PCR-DGGE effectués en commun.

Ensuite il y a, tous les stagiaires et thésards qui ont contribué à ces résultats, Aly bien sûr, Nadège, Clémentine, Cyril, Carmen, Fabien. J'aurai une pensée particulière pour Erik.

Je voudrais remercier aussi l'Université de Pau et des Pays de l'Adour, l'UNELLEZ, l'UCB, qui m'ont accompagné dans ce projet, et j'associe bien sûr Amaury, Isabel, Gyzell, Mary Lisbet, Wilmer, Elvis, Juan Fernandez, Juan Rodriguez, Miguel y Carlos.

Je remercie aussi Sabine Galindo, ma codirectrice de thèse, pour son soutien et ses conseils.

Je remercie Didier Montet, mon codirecteur de thèse mais aussi supérieur hiérarchique, qui m'a soutenu pendant ces 4 années de thèse et pour la confiance qu'il m'a accordé.

Je remercie Angélique Fontana, qui m'a soutenu et énormément aidé pendant mon Master et ensuite ma Thèse. Elle a toujours été présente pendant ces 6 années, même lors de moments difficiles pour elle.

Je ne serais surement pas Docteur aujourd'hui, si je n'avais pas rencontré Bernard, il m'a recruté, il m'a formé, il m'a poussé à faire un Master et ensuite une Thèse. Bernard, je vous serai éternellement reconnaissant.

Enfin je remercie mes parents de m'avoir encouragé, ma femme et mes enfants de m'avoir supporté (dans les deux sens du terme) pendant le Master et la Thèse.

Il y a aussi tous mes proches, mon frère, mes beaux-parents, mes beaux-frères, mes belles sœurs, mes tantes et oncles, cousins, cousines (Clans Donati et Buzançais).

Et bien sur tous mes amisd'ANIANE !!!!

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	10
LISTES DES FIGURES ET TABLEAUX.....	13
INTRODUCTION	22
1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	24
1.1. LE CAFE	25
1.1.1. Les caféiers	25
1.1.1.1. <i>Coffea arabica</i>	26
1.1.1.2. <i>Coffea canephora</i>	26
1.1.2. Le café vert : le fruit	27
1.1.2.1. Histologie de la fève de café vert.....	27
1.1.2.2. Composition chimique du café vert	29
1.1.3. La récolte et les traitements post récolte	33
1.1.3.1. La récolte	33
1.1.3.2. Traitements post récolte	33
1.1.3.3. Séchage.....	39
1.1.3.4. Décorticage et déparchage.....	40
1.1.3.5. Triage.....	40
1.1.3.6. Stockage	41
1.1.4. La torréfaction	41
1.1.5. Préparation de la boisson	42
1.2. ECOLOGIE MICROBIENNE DU CAFE.....	44
1.2.1. Les différentes flores.....	44
1.2.2. Etude de l'écologie microbienne par PCR-DGGE.....	46
1.2.2.1. Principe de la PCR-DDGE.....	46
1.2.2.2. Les applications de la PCR-DGGE.....	47
1.2.2.3. Les limites de la PCR-DGGE.....	48

1.3. MYCOTOXINES ET OCHRATOXINE A.....	51
1.3.1. Mycotoxines	51
1.3.2. Mycotoxinogénèse.....	54
1.3.3. Ochratoxine A (OTA).....	58
1.3.3.1. Structure chimique et propriétés physico-chimiques de l'OTA.....	59
1.3.3.2. Toxicologie de l'OTA.....	60
1.3.3.3. Législation sur l'OTA.....	63
1.3.3.4. OTA dans l'alimentation humaine.....	64
1.3.3.5. OTA et café.....	69
1.3.3.6. Moyens de maîtrise de la contamination par l'OTA.....	71
1.3.4. Moisissures productrices de l'ochratoxine A	82
1.3.4.1. Espèces fongiques productrices d'OTA	83
1.3.4.2. Souches productrices d'OTA dans le café	85
1.3.4.3. Identification des souches toxigènes.....	85
2. MATERIELS ET METHODES.....	90
2.1. MATERIEL VEGETAL.....	91
2.1.1. Café du Mexique.....	91
2.1.2. Café du Cameroun	92
2.1.3. Café du Venezuela	94
2.2. DOSAGE DE L'OTA ET DE SES DERIVES	96
2.2.1. Extraction et purification de l'OTA à partir des grains de café.....	96
2.2.2. Analyse des ochratoxines par HPLC : colonne et conditions opératoires.....	97
2.3. BIOLOGIE MOLECULAIRE	97
2.3.1. Protocoles d'extraction de l'ADN	97
2.3.1.1. Préparation des échantillons pour l'extraction de l'ADN des souches	97
2.3.1.2. Extraction des ADN	98
2.3.1.3. Contrôle de l'extraction d'ADN.....	99
2.3.2. Amplification des ADN extraits par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) ..	100

2.3.2.1.	Amplifications par PCR spécifiques des ADN d' <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. westerdijkiae</i> , <i>A. carbonarius</i>	100
2.3.2.2.	Amplifications par PCR couplées à une analyse par DGGE	102
2.3.3.	Électrophorèse en gel d'acrylamide avec gradient dénaturant (DGGE)	107
2.3.3.1.	Composition du gel de DGGE	107
2.3.3.2.	Préparation du gel DGGE	108
2.3.3.3.	Conditions de migration électrophorétiques de la DGGE	109
2.3.3.4.	Traitement d'image et traitement statistique des profils DGGE	110
2.3.4.	Séquençage des fragments d'ADN à partir des bandes DGGE	112
2.4.	MICROBIOLOGIE	113
2.4.1.	Souches fongiques	113
2.4.2.	Tests de compétition/inhibition	113
2.4.2.1.	Milieux de culture	113
2.4.2.2.	Protocole de culture	114
2.4.2.3.	Mesure de la compétition/inhibition	114
2.4.2.4.	Modalités	115
3.	RESULTATS ET DISCUSSION	116
3.1.	INCIDENCE DE LA DYNAMIQUE DES POPULATIONS MICROBIENNES SUR LA TENEUR EN OTA DU CAFE VERT	117
3.1.1.	Méthodologie existante sur d'autres matrices, adaptation à la matrice café	117
3.1.1.1.	Répétabilité	117
3.1.1.2.	Sensibilité de la méthode	119
3.1.2.	Etude de la flore microbienne totale : exemple du Mexique.	121
3.1.2.1.	Dynamique microbienne au cours des différents traitements	121
3.1.2.2.	Identification des souches	134
3.1.2.3.	Conclusion partielle	137
3.1.3.	Etude de la flore fongique et production d'OTA sur du café du Cameroun et du Venezuela	140
3.1.3.1.	Cameroun	140
3.1.3.2.	Venezuela	143
3.1.4.	Conclusion	147

3.2. MISE AU POINT D'UNE METHODE MOLECULAIRE DE DIFFERENCIATION SPECIFIQUE DE <i>ASPERGILLUS OCHRACEUS</i> / <i>ASPERGILLUS WESTERDIJKIAE</i>.....	148
3.2.1. Production d'OTA	150
3.2.2. Séparation par PCR-DGGE.....	151
3.2.3. Séquençage	155
3.2.4. Conclusion partielle.....	157
3.2.5. Application de la PCR-DGGE à la quantification d' <i>Aspergillus westerdijkiae</i> et <i>Aspergillus ochraceus</i>	158
3.2.6. Conclusion.....	162
3.3. ETUDE DES PHENOMENES D'INHIBITION-COMPETITION INTERSPECIFIQUES ENTRE SOUCHES OCHRATOXINOGENES.....	163
3.3.1. Etude de la croissance et de la production d'OTA lors de co-cultures d' <i>A.</i> <i>carbonarius</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. ochraceus</i> et <i>A. westerdijkiae</i>	164
3.3.2. Influence des niveaux d'inoculation des compétiteurs	168
3.3.3. Etude du mécanisme de compétition	176
3.3.4. Conclusion.....	186
4. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	191
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	198

Liste des abréviations

Ac *Aspergillus carbonarius*

ACP Analyse en Composantes Principales

ADN Acide désoxyribonucléique

ADNr 16S ADN codant pour la sous unité 16S de l'ARN ribosomal

ADNr 26S ADN codant pour la sous unité 26S de l'ARN ribosomal

ADNr 28S ADN codant pour la sous unité 28S de l'ARN ribosomal

ADNr Acide désoxyribonucléique ribosomique

AFLP Amplified Fragment Length Polymorphism

AFNOR Association Française de Normalisation

An *Aspergillus niger*

ANOVA Analyse de la variance

Ao *Aspergillus ochraceus*

AOAC Association of Official Agricultural Chemists

APS Persulfate d'ammonium

ARDRA Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis

ARN Acide ribonucléique

ARNr ARN ribosomal

ASIC Association Scientifique Internationale du Café

Aw Activité de l'eau

Awe *Aspergillus westerdijkiae*

BET Bromure d'éthidium

CAS Chemical Abstracts Service

CBS Centraalbureau voor Schimmelcultures

CE Communauté Européenne

CFQA Acides caféylférulylquiniques

CIRAD Centre International de Recherche Agronomique pour le Développement

p-CoQA Acides p-coumarylquiniques

CQA Acides caféylquiniques

5-CQA Acide caféyl 5-quinique

DGGE Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

DL50 Dose Létale médiane

DMSO Di methyl sulfoxyde
DQA Acides di-caféylquiniques
EDTA Ethylenediaminetetraacetic acid
FAO Food and Agriculture Organization
FCQA Acides férulylcaféylquiniques
FQA Acides férulylquiniques
GEMS/Food Global Environment Monitoring System/Food
GC Chromatographie en phase gazeuse
HPLC Chromatographie Liquide Haute Performance
HR Humidité relative
IARC International Agency for Research on Cancer
IgA Immuno-globuline A
IgG Immuno-globuline G
IgM Immuno-globuline M
ISO Organisation Internationale de Normalisation
IUPAC Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée
JECFA Comité mixte FAO/OMS d'experts des additifs alimentaires
kb Kilo paires de bases
M Molarité
MATAB Mixed Alkyl Trimethyl Ammonium Bromide
MUCL Mycothèque de l'Université Catholique de Louvain
NF Norme Française
dNTP Deoxynucléotide triphosphate
ODS Octadecyl-Silane
OMS Organisation Mondiale de la Santé
OTA Ochratoxine A
OT α Ochratoxine α
OTB Ochratoxine B
OTC Ochratoxine C
d-OTA Ochratoxine A deutérée
DC-OTA OTA décarboxylée
OE-OTA Ethylamide d'OTA
OM-OTA OTA o-méthylée
M-OT α Méthylester d'OT α

p/v Masse sur volume
pb Paires de bases
PBS Solution saline de phosphate tamponnée
PCR Polymerase Chain Reaction
pH Potentiel hydrogène
ppb parts par billion
RAPD Randomly Amplified Polymorphic DNA
RFLP Restriction Length Fragment Polymorphism
rpm Rotation par minute
S Svedberg
SCF Comité Scientifique pour les Aliments de la Commission Européenne
SCOOP Groupe de Coopération Scientifique
SDS Sodium dodecyl sulphate
SSCP Single-Stranded Conformation Polymorphism
TAE Tris/ Ammonium/ EDTA (tampon)
TE Tris/ EDTA (tampon)
TEMED N, N, N', N' Tétraméthyléthylènediamine
TGGE Temperature Gradient Gel Electrophoresis
Tm Température de fusion
UCBE Unidad Compacta de Beneficio Ecológico
UE Union Européenne
UFC Unité Formant Colonie
UV Ultraviolet
Vha Voie humide Andrade
Vhj Voie humide Jocutla
Vs Voie sèche
v/v Volume sur volume
WHO World Health Organization

Listes des figures et tableaux

Liste des figures

1. Etude bibliographique

Figure 1.1 : Répartition géographique de la culture du café

Figure 1.2 : Fleurs de caféiers

Figure 1.3 : Cerises de café

Figure 1.4 : Structure du fruit et de la graine du caféier

Figure 1.5 : Principales étapes du traitement du café par la voie humide

Figure 1.6 : Principales étapes du traitement du café par la voie sèche

Figure 1.7 : Dépulpage mécanique de cerises de café durant un traitement post récolte par voie humide : Dépulpeur à tambour (Venezuela)

Figure 1.8 : Etape de fermentation sous eau du café durant un traitement post récolte par voie humide (Venezuela)

Figure 1.9 : Aire de séchage de cafés coques provenant d'un traitement par voie sèche (Venezuela)

Figure 1.10 : Système de séchage de cafés parche provenant d'un traitement par voie humide (Venezuela)

Figure 1.11 : Schéma du principe de la PCR-DGGE

Figure 1.12 : Structure de l'Ochratoxine A

Figure 1.13 : Contribution de différentes denrées alimentaires à l'exposition moyenne de la population européenne à l'OTA (d'après Task 3.2.7, European Commission 2002).

2. Matériels et méthodes

Figure 2.1 : Situation géographique des lieux de prélèvements du café au Mexique : Fincas Jocutla, Andrade, Zongolica. Province de Vera Cruz.

Figure 2.2 : Situation géographique des lieux de prélèvements du café au Cameroun : Bafoussam, Dschang, Bafang, Melong, Santchou.

Figure 2.3 : Situation géographique des lieux de prélèvements du café au Venezuela : Biscucuy et Chabasquen. Municipio de Sucre, Etat Portuguesa.

Figure 2.4 : Conditions de préparation du gel de DGGE

Figure 2.5 : Calcul de la position relative (PR) de chaque bande par exploitation d'un gel DGGE

3. Résultats et Discussion

3.1 Incidence de la dynamique des populations microbiennes sur la teneur en OTA du café vert

Figure 3.1.1. Profils DGGE obtenus à partir de 10 échantillons d'ADN provenant du même lot de café : Répétabilité de la méthode PCR-DGGE

Figure 3.1.2 : Analyse de similarité de 10 échantillons provenant du même lot de café.

Figure 3.1.3 : Photo de gel de DGGE des différentes concentrations de *Aspergillus*

Figure 3.1.4 : Profils DGGE des échantillons de café correspondant aux différentes étapes du traitement du café de la finca Andrade

Figure 3.1.5 : Evolution qualitative des différentes flores microbienne dans les échantillons correspondant aux différentes étapes du traitement du café de la finca Andrade

Figure 3.1.6 : Profils DGGE des échantillons correspondant aux différentes étapes du traitement du café de la finca Jocutla

Figure 3.1.7 : Evolution qualitative des différentes flores microbienne dans les échantillons correspondant aux différentes étapes du traitement du café de la finca Jocutla

Figure 3.1.8 : Profils DGGE des échantillons correspondant aux différents jours de séchage durant le traitement par voie sèche du café de la finca Zongolica

Figure 3.1.9 : Evolution qualitative des différentes flores microbienne dans les échantillons correspondant aux différents jours de séchage durant le traitement par voie sèche du café de la finca Zongolica

Figure 3.1.10 : Photo de gel de DGGE présentant les amplicons d'ADNr de différentes souches pures de moisissures

Figure 3.1.11 : Photo de gel de DGGE présentant les amplicons amplifiés de l'ADNr de différentes souches pures de levures

Figure 3.1.12 : Exemple de BLAST d'une séquence d'un fragment PCR de moisissure séparé par DGGE.

Figure 3.1.13 : Répartition des espèces microbiennes en fonction du traitement post-récolte

Figure 3.1.14 : Evolution quantitative des espèces des différentes flores microbiennes présentes sur le café en fonction des étapes du traitement post-récolte dans les trois fincas

Figure 3.1.15 : Profils DGGE (ADNr de moisissures) d'échantillons de café vert provenant de différentes zones du Cameroun

Figure 3.1.16 : Répartition des espèces de moisissures issues des échantillons du café du Cameroun en fonction du traitement, de la variété, de l'origine géographique et de la teneur en OTA

Figure 3.1.17 : Profils DGGE (ADNr de moisissures) d'échantillons de café vert provenant de la zone de Biscucuy au Vénézuéla

Figure 3.1.18 : Dendrogramme de similarité des espèces de moisissures issues des échantillons du café du Vénézuéla en fonction de la qualité du café et de la teneur en OTA

3.2 Mise au point d'une méthode moléculaire de différenciation spécifique de *Aspergillus ochraceus* / *Aspergillus westerdijkiae*

Figure 3.2.1 : Production d'OTA à 7 jours sur milieu PDA pH 3.5, par la souche référence *Aspergillus westerdijkiae* MULC 44640 (souche 1) et les souches isolées du café (souches 2 à 7)

Figure 3.2.2 : Contrôle des produits PCR après amplification à l'aide des amorces β tub et OCA_DGGE

Figure 3.2.3 : Séparation par PCR-DGGE des amplicons à l'aide des amorces OCA_DGGE pour les souches de référence *Aspergillus westerdijkiae* CBS 112.803, *Aspergillus westerdijkiae* MULC 44640 (souche 1) *Aspergillus ochraceus* CBS 108.08 et isolées du café (2 à 7 en duplicat).

Figure 3.2.4 : Alignement et comparaison des séquences (sens) Forward des souches de référence *Aspergillus westerdijkiae* CBS 112.803 et *Aspergillus ochraceus* CBS 108.08 et des souches isolées du café.

Figure 3.2.5 : Alignement et comparaison des séquences (anti sens) Reverse des souches de référence *Aspergillus westerdijkiae* CBS 112.803 et *Aspergillus ochraceus* CBS 108.08 et des souches isolées du café.

Figure 3.2.6 : Photographie de gel DGGE montrant les amplicons ADNr de souches d'*Aspergillus westerdijkiae* CBS 112.803 et *Aspergillus ochraceus* CBS 108.08 pures et en mélange, à différents niveaux de concentration d'ADN initial.

Figure 3.2.7 : Courbe de corrélation entre la quantité en ADN d'*Aspergillus westerdijkiae* et le volume de la bande DGGE

Figure 3.2.8 : Courbes de corrélation entre la quantité en ADN d'*Aspergillus ochraceus* et le volume de la bande DGGE

Figure 3.2.9 : Photographie de gel DGGE de souches d'*Aspergillus westerdijkiae* CBS 112.803 et *Aspergillus ochraceus* CBS 108.08 amplifiées par PCR séparément et en mélange

3.3 Etude des phénomènes d'inhibition-compétition interspécifiques entre souches ochratoxinogènes

Figure 3.3.1 : Exemple de développement d'*Aspergillus* en culture isolée ou en couple compétiteur avec co-ensemencement central sur milieu PDA:

Figure 3.3.2 : Croissance apicale à 3 (J3), 5 (J5) et 7 (J7) jours après co-ensemencement central sur milieu PDA pH 3.5 des couples *A.westerdijkiae/A. niger*, *A. westerdijkiae/A. ochraceus*, *A. westerdijkiae/ A. carbonarius*, *A. ochraceus/A. niger*, *A. ochraceus/A. carbonarius*, *A. carbonarius A. niger*

Figure 3.3.3 : Production d'OTA à 7 jours après co-ensemencement central sur milieu PDA pH 3,5 des couples des couples *A.westerdijkiae/A. niger*, *A.*

westerdijkiae/A. ochraceus, *A. westerdijkiae/ A. carbonarius*, *A. ochraceus/A. niger*, *A. ochraceus/A. carbonarius*, *A. carbonarius A. niger*

Figure 3.3.4 : Inhibition de la croissance de *Aspergillus westerdijkiae* (Awe) par *Aspergillus niger* (An) après co-ensemencement central sur milieu PDA pH 3,5 pour différents niveaux d'inoculation de *Aspergillus niger* (An)

Figure 3.3.5 : Production d'OTA par *Aspergillus westerdijkiae* (Awe) et *Aspergillus niger* (An) après co-ensemencement central sur milieu PDA pH 3,5 pour différents niveaux d'inoculation de *Aspergillus niger* (An)

Figure 3.3.6 : Croissance apicale à 3 (J3), 5 (J5) et 7 (J7) jours après co-ensemencement central sur milieu PDA pH 3.5 de *Aspergillus westerdijkiae* (Awe) par *Aspergillus ochraceus* (Ao) après co-ensemencement central sur milieu PDA pH 3,5 pour différents niveaux d'inoculation de *Aspergillus ochraceus* (Ao)

Figure 3.3.7 : Gel DGGE représentant à des jours différents (3,5 et 7 jours) la croissance d'*A.westerdijkiae* seul et en co-culture avec *A.ochraceus* à différents niveaux d'inoculation de Ao

Figure 3.3.8 : Inhibition de la croissance de *Aspergillus westerdijkiae* (Awe) par *Aspergillus ochraceus* (Ao) après co-ensemencement central sur milieu PDA pH 3,5 pour différents niveaux d'inoculation de *Aspergillus ochraceus* (Ao)

Figure 3.3.9 : Production d'OTA par *Aspergillus westerdijkiae* (Awe) et *Aspergillus ochraceus* (Ao) après co-ensemencement central sur milieu PDA pH 3,5 pour différents niveaux d'inoculation de *Aspergillus ochraceus* (Ao)

Figure 3.3.10 : Exemple de développement d'*Aspergillus* en culture isolée ou en couple compétiteur avec ensemencement de par et d'autres de la ligne médiane de la boîte de pétri sur milieu PDA:

Figure 3.3.11 : Points de prélèvement pour la mesure de la production d'OTA par *Aspergillus westerdijkiae* (Awe) en co-culture avec *Aspergillus niger* (An) ou *Aspergillus ochraceus* (Ao) sur milieu PDA pH 3,5

Figure 3.3.12: Teneur en OTA dans le milieu de culture (PDA pH 3,5) en fonction des cinq points de prélèvement dans la boîte de Pétri

Figure 3.3.13 : Croissance apicale à 3 (J3), 5 (J5), 7 (J7) et 11 (J11) jours après co-ensemencement central sur milieu « café » des couples *Aspergillus westerdijkiae/Aspergillus niger* (Awe/An), *Aspergillus westerdijkiae/Aspergillus ochraceus* (Awe/Ao)

Figure 3.3.14 : Inhibition de la croissance apicale de *Aspergillus westerdijkiae* (Awe) par *Aspergillus ochraceus* (Ao) à 3 (J3), 5 (J5), 7 (J7) jours après co-ensemencement central sur milieu « café » du couple *Aspergillus westerdijkiae/Aspergillus ochraceus* (Awe/Ao)

Figure 3.3.15 : Production d'OTA à 3 (J3), 5 (J5), 7 (J7) et 11 (J11) jours après co-ensemencement central sur milieu « café » des couples *Aspergillus westerdijkiae/Aspergillus niger* (Awe/An), *Aspergillus westerdijkiae/Aspergillus ochraceus* (Awe/Ao)

Figure 3.3.16: Croissance apicale à 3 (J3), 5 (J5), 7 (J7) et 11 (J11) jours après co-ensemencement central sur milieu « café + OTA » des couples *Aspergillus westerdijkiae/Aspergillus niger* (Awe/An), *Aspergillus westerdijkiae/Aspergillus ochraceus* (Awe/Ao)

Figure 3.3.17 : Inhibition de la croissance apicale de *Aspergillus westerdijkiae* (Awe) par *Aspergillus ochraceus* (Ao) à 3 (J3), 5 (J5), 7 (J7) jours après co-ensemencement central sur milieu « café + OTA » du couple *Aspergillus westerdijkiae/Aspergillus ochraceus* (Awe/Ao)

Figure 3.3.18 : Production d'OTA à 3 (J3), 5 (J5), 7 (J7) et 11 (J11) jours après co-ensemencement central sur milieu « café + OTA » des couples *Aspergillus westerdijkiae/Aspergillus niger* (Awe/An), *Aspergillus westerdijkiae/Aspergillus ochraceus* (Awe/Ao)

Figure 3.3.19 : Evolution des teneurs en OTA et OT α sur 11 jours après co-ensemencement central sur milieu « café » du couple *Aspergillus westerdijkiae/Aspergillus ochraceus* (Awe/Ao)

Figure 3.3.20 : Evolution des teneurs en OTA et OT α sur 11 jours après co-ensemencement central sur milieu « café + OTA » du couple *Aspergillus westerdijkiae/Aspergillus ochraceus* (Awe/Ao)

Figure 3.3.21 : Comparaison des vitesses moyennes de croissance à 7 jours dans les milieux PDA, « café » et « café + OTA »

Liste des tableaux

1. Etude bibliographique

Tableau 1.1 : Composition biochimique du café (en % de Matières Sèches) en fonction des espèces

Tableau 1.2 : Mycotoxines contaminant les produits alimentaires et espèces fongiques associées

Tableau 1.3 : Teneurs maximales en OTA admises dans les aliments réglementés (Règlement CE 123/2005)

Tableau 1.4 : Teneur en OTA dans quelques produits alimentaires

2. Matériels et méthodes

Tableau 2.1 : Données géographiques et techniques des lieux de récolte des échantillons au Mexique.

Tableau 2.2 : Données géographiques et techniques des lieux de récolte des échantillons au Cameroun

Tableau 2.3 : Données géographiques et techniques des lieux de récolte des échantillons au Venezuela

Tableau 2.4 : Amorces pour l'amplification spécifique de l'ADN génomique de *A.niger*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*.

Tableau 2.5 : Milieu réactionnel pour l'amplification spécifique de l'ADN génomique de *A.niger*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*.

Tableau 2.6 : Conditions des réactions de PCR pour l'amplification spécifique de l'ADN génomique de *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*

Tableau 2.7 : Séquence des amorces ADN utilisées en PCR-DGGE pour analyser les ADN de bactéries, levures et moisissures

Tableau 2.8 : Composition du mélange réactionnel pour l'amplification par PCR des ADN bactériens, des levuriens et des moisissures

Tableau 2.9 : Conditions des réactions de PCR pour les ADN bactériens avant DGGE

Tableau 2.10 : Conditions des réactions de PCR pour les ADN levuriens avant DGGE

Tableau 2.11 : Conditions des réactions de PCR pour les ADN de moisissures avant DGGE

Tableau 2.12 : Composition des solutions de préparation des gels de DGGE ayant un gradient de dénaturant de 30 à 60% (ADN levuriens et bactériens) et 40 à 70% (ADN de moisissures)

3. Résultats et Discussion

3.1 Incidence de la dynamique des populations microbiennes sur la teneur en OTA du café vert

Tableau 3.1.1: Limites de détection par DGGE de cultures pures pour des moisissures *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger* (spores/mL).

Tableau 3.1.2 : Nombre de bandes représentatives des bactéries (B), levures (L) et moisissures (M) obtenues de l'analyse des gels DGGE en fonction de l'étape du traitement dans la finca Andrade

Tableau 3.1.3 : Nombre de bandes représentatives des bactéries (B), levures (L) et moisissures (M) obtenues de l'analyse des gels DGGE en fonction De l'étape du traitement dans la finca Jocutla

Tableau 3.1.4 : Nombre de bandes représentatives des bactéries (B), levures (L) et moisissures (M) obtenues de l'analyse des gels DGGE en fonction De l'étape du traitement dans la finca Zongolica

Tableau 3.1.5 : Caractéristiques des échantillons de café du Cameroun (vh : traitement par voie humide ; vs : traitement par voie sèche ; A : café arabica ; R : café robusta ; bfss : Bafoussam ; dsh : Dschang ; baf : Bafang ; mel : Melong ; san : Santchou ; nd : non détectable)

Tableau 3.1.6 : Caractéristiques des échantillons de café du Vénézuéla (C ou conv : « conventional » ; O ou G.O : « Grano de Oro » ; nd :non détectable)

3.2 Mise au point d'une méthode moléculaire de différenciation spécifique de *Aspergillus ochraceus* / *Aspergillus westerdijkiae*

Tableau 3.2.1 : Références des souches utilisées pour la différenciation *A.ochraceus* et *A.westerdijkiae*.

Tableau 3.2.2 : Amorces pour l'amplification de l'ADN génomique de, *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*.

3.3 Etude des phénomènes d'inhibition-compétition interspécifiques entre souches ochratoxinogènes

Tableau 3.3.1 : Influence du milieu de culture sur la vitesse de croissance (en mm/j) moyenne à J7 après co-ensemencement central des couples Awe/An, Awe/Ao (5 µL de suspensions à 10⁶ spores/mL de chacune des 2 souches).

Introduction

En 2011, la production mondiale de café atteignait 130 millions de sacs, soit environ 7,8 millions de tonnes (60 kg/sac) (ICO, 2012). Le plus gros pays producteur est le Brésil, suivi par le Viêt Nam et la Colombie. Les caféiers sont en effet des arbustes des régions tropicales du genre *Coffea* de la famille des Rubiacées. Les espèces *Coffea arabica* (la plus anciennement cultivée) et *Coffea canephora* (ou caféier *robusta*) sont celles qui servent à la préparation de la boisson qui est une des plus consommée au monde.

L'ochratoxine A (OTA) est une mycotoxine produite par certaines moisissures des genres *Aspergillus* et *Penicillium* (Pitt *et al.*, 2000 ; Abrunhosa *et al.*, 2001 ; O'Callaghan *et al.*, 2003). Dans les zones tropicales l'OTA est principalement produite dans le café par *A. ochraceus* et *A. westerdijkiae* (Taniwaki *et al.*, 2003; Frisvad *et al.*, 2004; Samson *et al.*, 2006; Bacha *et al.*, 2009). L'OTA suscite une attention particulière pour ses effets néphrotoxiques, immunotoxiques, tératogènes et cancérogènes (Abarca *et al.*, 1994, Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1999) et l'Agence Internationale pour la Recherche en Cancérologie a classé l'OTA comme cancérogène possible pour l'espèce humaine (groupe 2B) (IARC, 1993). L'OTA contamine différents produits alimentaires d'origine végétale et animale comme le café, le cacao, les céréales, les épices, les fruits secs, le raisin, la viande et les abats de porc ou de volaille (Pittet *et al.*, 1996 ; WHO, 1996 ; Blanc *et al.*, 1998 ; Hurst et Martin, 1998 ; Jorgensen, 1998 ; Skaug, 1999 ; Thirumala-Devi *et al.*, 2001 ; Miraglia et Brera, 2002 ; Mounjouenpou *et al.*, 2008). A cause de sa structure moléculaire et notamment sa thermostabilité (Boudra *et al.*, 1995), l'OTA est également souvent présente dans les produits transformés (Chiavaro *et al.*, 2002 ; Miraglia et Brera, 2002). Les céréales, le vin et le café sont les aliments qui contribuent le plus à l'ingestion humaine d'OTA : respectivement pour 50, 13 et 10% en Europe. La législation européenne a fixé un seuil maximal pour l'OTA dans le café torréfié (5,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) et le café instantané (10,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) (Règlement de la Commission européenne, 1881/2006), mais il n'existe pas encore de limite pour le café vert. Selon la FAO (2006) cette norme sur le café torréfié pourrait entraîner un taux moyen de refus d'environ 7% des expéditions, ce chiffre pouvant aller jusqu'à 18% dans certains cas.

L'influence des différents traitements intervenant jusqu'à la préparation de la boisson sur la contamination du café par l'OTA a fait l'objet de nombreuses études. La présence d'OTA dans les grains de café peut être mise en relation avec les conditions de récolte (Paulino de Moreas et Luchese, 2003), de traitement post-récolte (Bucheli *et al.*, 2000 ; Romani *et al.*, 2000 ; Suárez-Quiroz *et al.*, 2005a ; Suárez-Quiroz *et al.*, 2005b ; Duris *et al.*, 2010), en particulier au cours du traitement par voie sèche (Bucheli *et al.*, 2002 ; Urbano *et al.*, 2001), et de stockage et transport (Bucheli *et al.*, 1998) mais également avec les conditions de torréfaction. (Suárez-Quiroz *et al.*, 2005b ; Ferraz *et al.*, 2010)

Dans ce contexte et afin de pouvoir limiter la contamination du café par l'OTA, le travail réalisé au cours de cette thèse a pour principaux objectifs :

- améliorer les connaissances sur la dynamique des populations microbiennes au cours de la transformation post-récolte du café en relation avec la contamination en OTA du café vert afin de pouvoir établir un profil moléculaire et un potentiel toxigène.
- étudier les relations interspécifiques entre souches ochratoxinogènes avec différents potentiels toxigènes et évaluer de possibles antagonismes endogènes.

Les questions de recherche posées lors de cette étude et auxquelles nous avons essayé de répondre ont donc été les suivantes :

- Est-ce que la dynamique des populations microbiennes du café peut être suivie par PCR-DGGE au cours des étapes des différents traitements post-récolte ?
- Y a-t-il une relation entre un profil DGGE de moisissures et la contamination en OTA du café vert ?
- Y a-t-il une possibilité de différenciation spécifique de *Aspergillus ochraceus* / *Aspergillus westerdijkiae* par une méthode moléculaire ?
- Est-il possible de « quantifier » la souche d'*Aspergillus westerdijkiae* par PCR-DGGE couplée à une analyse d'image ?
- Est-ce qu'il existe des compétitions inter *Aspergillus* ochratoxinogènes et quels sont les effets de différentes conditions nutritionnelles sur celles-ci ?

1. Etude bibliographique

1.1. Le café

1.1.1. Les caféiers

Le caféier est une plante pérenne de la famille des rubiacées du genre *Coffea*. Il existe 70 espèces botaniques dont les deux plus connues sont l'Arabica et le Robusta, les noms scientifiques sont respectivement *Coffea arabica* et *Coffea canephora*.

Les caféiers sont tous diploïdes ($2n=2X=22$) et quasiment tous strictement allogames à l'exception notable de *Coffea arabica* qui est un allotétraploïde ($2n=4X=44$) autocompatible. Toutes les espèces diploïdes du genre dériveraient d'un même génome ancestral (Charrier et Eskes, 1997) ; *C. arabica* résulterait de l'association entre deux génomes diploïdes issus de deux espèces, dont *C. canephora*.

Le caféier requiert le climat chaud et humide des régions tropicales ou subtropicales. La culture du caféier trouve son terrain de prédilection dans la ceinture équatoriale délimitée par les 30^e parallèles Nord et Sud (Figure 1.1). L'arbuste peut atteindre 6 à 8 m. A la floraison, les fleurs se disposent par groupes (Figure 1.2) et donnent naissance à des fruits communément appelés cerises. Les cerises mesurent jusqu'à 18 mm de longueur et 10-25mm de diamètre.

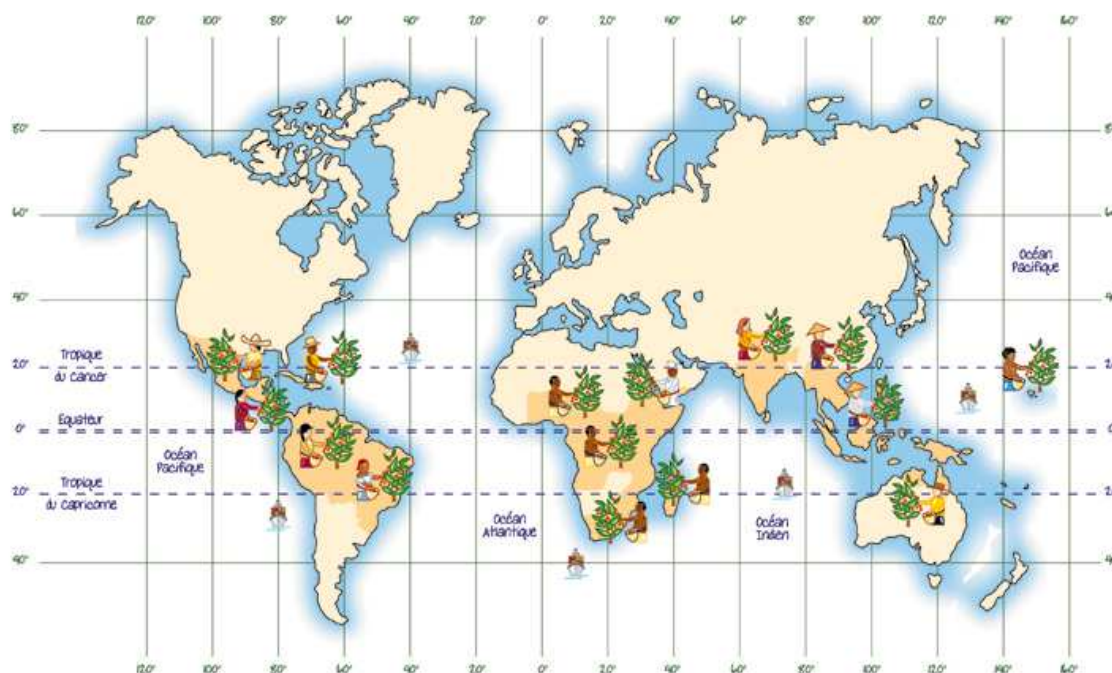


Figure 1.1 : Répartition géographique de la culture du café



Figure 1.2 : Fleurs de caféiers

1.1.1.1. *Coffea arabica* (70% de la production mondiale)

L'arbuste Arabica atteint 3 à 5 m de hauteur lorsqu'il est cultivé mais peut atteindre 10 m de hauteur à l'état sauvage. C'est un arbuste fragile, originaire des hauts plateaux d'Ethiopie, qui pousse de 800 à 2000 m d'altitude. Il a des feuilles vert foncé et brillantes ainsi qu'un tronc droit. Il connaît deux à trois floraisons par an. Lorsque ses fleurs blanches et odorantes tombent, c'est pour laisser place à des fruits de couleurs rouges (à maturité) appelés cerises ou drupes. *C. arabica* est une espèce qui comprend des variétés comme Typica, Maragogype, Bourbon, Blue Mountain ou Mundo Novo. Sa culture s'étend sur les hauts plateaux d'Amérique latine et d'Afrique de l'Est essentiellement. Le café issu de l'Arabica est considéré comme le haut de gamme des cafés, grâce à son arôme, à sa finesse et sa douceur.

1.1.1.2. *Coffea canephora* (30% de la production mondiale)

L'arbuste *Coffea canephora* pousse généralement en plaine et préfère la chaleur et l'humidité. Il présente habituellement des hauteurs de 5 à 8 m. Ses feuilles sont d'un vert plus clair que celles du *Coffea arabica* et ses graines sont plus petites. Il pousse à l'état sauvage dans presque toutes les forêts de la zone tropicale africaine. La fertilisation s'effectue par les insectes butineurs qui réalisent la pollinisation croisée des fleurs d'un arbuste à l'autre. Le *C. canephora* est renommé pour sa robustesse

agronomique, d'où son nom commercial de Robusta. Il est principalement cultivé dans les zones tropicales humides de basse altitude.

1.1.2. Le café vert : le fruit

1.1.2.1. Histologie de la fève de café vert

La cerise du café (Figure 1.3) est classée dans les drupes, c'est-à-dire les fruits à mésocarpe charnu et à endocarpe ligneux. D'un point de vue morphologique, la drupe de café est un fruit ellipsoïdal (d'environ 1 x 2 cm) contenant deux noyaux bombés sur une face et plats sur l'autre. La prolifération cellulaire durant la phase d'accroissement du fruit reste très limitée car l'épaisseur du mésocarpe n'excède jamais 2 mm. Au cours de la maturation, le fruit passe d'une couleur verte au rouge ou orange intense selon les espèces.



Figure 1.3 : Cerises de café

Ce fruit est composé, comme toutes les drupes, d'un péricarpe qui recouvre l'endosperme (grains). Ce péricarpe est constitué d'un exocarpe (peau), d'un mésocarpe (pulpe et tissu mucilagineux) et d'un endocarpe (parche). Il correspond à la partie charnue des drupes comestibles (cerise, mangue,...) et son épaisseur varie selon les espèces de caféiers de 1 à 1,7 mm (Ouguerram, 1989). La Figure 1.4 présente la coupe d'une cerise de café.

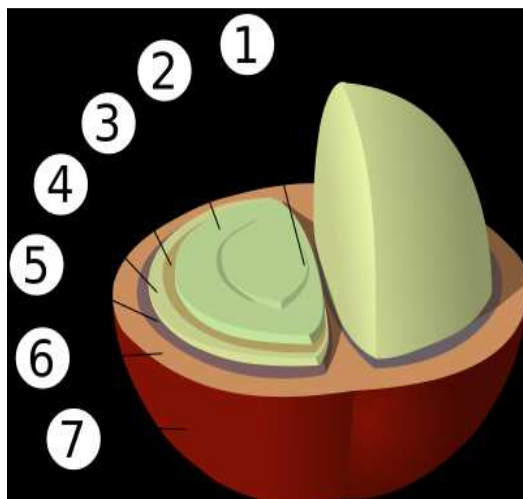


Figure 1.4 : Structure du fruit et de la graine du caféier
 1: sillón central, 2: grain de café (endosperme), 3: peau du grain (tégument), 4: parchemin (endocarpe), 5: couche de pectine, 6: pulpe (mésocarpe), 7: peau du fruit (exocarpe)

1.1.2.1.1. Le mésocarpe externe

Le mésocarpe externe, souvent appelé pulpe, est composé de cellules parenchymateuses de petite taille à parois primaires et de diamètre croissant en allant vers l'intérieur du fruit. Les parois des cellules du mésocarpe externe de café sont compactes et denses lorsque le fruit est vert et après subissent une « fonte » ou amincissement des régions intercellulaires. Ce mécanisme appelé dégradation autolytique est responsable de la texture et de la succulence des fruits charnus (Ouguerram, 1989).

La composition chimique du mésocarpe externe (ou pulpe) varie selon la maturité et l'espèce des fruits analysés. La teneur en eau varie également selon le mode de traitement des fruits de 62 à 76%. Les sucres réducteurs représentent environ 12% de la matière sèche avec une prédominance de fructose. La pulpe de café, par sa composition en glucides et protéines, constitue un sous-produit valorisable en alimentation animale malgré la présence de facteurs antinutritionnels (caféine et composés phénoliques) (Clifford et Ramirez, 1991a,b). Son utilisation par compostage organique a également été envisagée pour l'agriculture.

1.1.2.1.2. Le mésocarpe interne

Le mésocarpe interne est une organisation tissulaire avec des cellules à parois fragiles et jointives de type primaire, riche en substance peptiques (Garcia *et al.*, 1991), il représente environ 20% de la matière fraîche et 55% de la matière sèche du fruit. Son épaisseur varie de 40 à 700 µm selon les espèces et peut atteindre 2 mm

pour les cafés de haute altitude. Le terme de mucilage est généralement utilisé par abus de langage pour désigner le mésocarpe interne de café et rappeler sa texture visqueuse ; le terme de tissu mucilagineux est le plus approprié. Contrairement à ce qui était antérieurement publié (Menchù et Rolz, 1973), des travaux récents ont permis de montrer que la fluidification du tissu mucilagineux pendant la fermentation naturelle du café semble plus être due à des modifications physico-chimiques des parois cellulaires qu'à des dégradations enzymatiques des polysaccharides pariétaux (Avallone *et al.*, 2001a, b; Avallone *et al.*, 2002).

1.1.2.1.3. L'endocarpe

L'endocarpe aussi appelé parche est un tissu secondaire lignifié d'environ 150 µm d'épaisseur. Sous la parche, une fine membrane appelée pellicule argentée (ou épiderme interne) recouvre deux graines de tissu parenchymateux de réserve portant un sillon central sur leur face plane.

1.1.2.2. Composition chimique du café vert

Les composés biochimiques (Clarke et Macrae, 1985) rencontrés dans les grains verts sont les glucides, les lipides, les protéines, les dérivés azotés non protéiques, les acides organiques et les substances minérales. Le Tableau 1.1 illustre les données chiffrées relatives aux espèces *Coffea arabica* et *Coffea canephora*.

Tableau 1.1 : Composition biochimique du café (en % de Matières Sèches) en fonction des espèces

Constituants (%MS)	Arabica	Robusta
Caféine	0,9-1,2	1,6-2,4
Trigonelline	1,0-1,2	0,6-0,75
Acides chlorogéniques	5,5-8,0	7,0-10,0
Lipides	12,0-18,0	9,0-13,0
Acides aliphatiques	1,5-2,0	1,5-2,0
Oligosaccharides	6,0-8,0	5,0-7,0
Polysaccharides	50,0-55,0	37,0-47,0
Acides Aminées	2,0	2,0
Minéraux	3,0-4,2	4,0-4,5
Protéines	11,0-13,0	11,0-13,0

La plupart des composés biochimiques du café vert sont à l'origine des arômes caractéristiques du café, après torréfaction, et sont dénommés « précurseurs d'arômes ».

1.1.2.2.1. Les Acides chlorogéniques (CGA)

Les acides chlorogéniques ou esters d'acides quiniques constituent les plus importants composés phénoliques du métabolisme secondaire dans le règne végétal. Les acides chlorogéniques sont des précurseurs de la lignine (Hahlbroch et Grisebach, 1979). Ils participent au contrôle de la germination et de la croissance cellulaire. Ils sont impliqués également dans les mécanismes de défense contre les phytopathogènes (Echandi et Fernandez, 1962 ; Zulaga *et al.*, 1971 ; Waites *et al.*, 1978 ; Macheix *et al.*, 1990).

Chez les végétaux, ils sont communément subdivisés en six classes :

- les acides caféylquiniques (CQA),
- les acides di-caféylquiniques (DQA),
- les acides férulylquiniques (FQA),
- les acides p-coumarylquiniques (p-CoQA),
- les acides caféylférulylquiniques (CFQA),
- les acides férulylcaféylquiniques (FCQA).

Chez les caféiers, les trois premières classes (CQA, DQA et FQA) représentent plus de 98% de la fraction totale en acides chlorogéniques CGA (Clifford et Staniforth, 1977 ; Morishita *et al.*, 1989). Chacune de ces classes est composée de trois isomères. Ces derniers diffèrent par le nombre et la nature du résidu acide hydroxycinnamique (acide caféique ou acide férulique) estérifié sur les positions 3,4 et / ou 5 de l'acide quinique. L'isomère acide caféyl 5-quinique (5-CQA) est le constituant majoritaire dans le café vert (Clifford, 1985).

1.1.2.2.2. La caféine (triméthyl-1,3,7 xanthine)

La caféine est l'alcaloïde majoritaire du café. Composé très stable, il est connu pour être un stimulant du système nerveux central. La caféine confère aux plantes une résistance aux attaques d'éventuels pathogènes. Ainsi, son effet inhibiteur de croissance fongique a été clairement démontré chez :

- *Manocrosporium ambrosium* (Kumar *et al.*, 1995).
- *Aspergillus ochraceus* (Gueule *et al.*, 2006).
- *Colletotrichum kahawae* (Biratu *et al.*, 1997).

La voie de biosynthèse conduisant à la formation de la caféine chez les caféiers est actuellement bien connue (Schulthess et Baumann, 1995). Cette dernière a lieu principalement au niveau de l'exocarpe et du mésocarpe du fruit. La caféine migre ensuite vers la graine durant la maturation. Dans les tissus de grains de café, la caféine est liée aux isomères d'acides chlorogéniques et particulièrement au 5-CQA (Baumann *et al.*, 1993) et au 3,5-DQA (Kappeler *et al.*, 1987 ; Baumann et Röhrig, 1989).

1.1.2.2.3. Les glucides

Une fois séché, le grain vert contient 55 % en MS de polysaccharides totaux. Ils constituent la majeure partie des glucides. Pour *C.arabica*, le saccharose est le sucre majoritaire dans le café vert, il représente 98 % des polysaccharides totaux (Clifford, 1985). Ce diholoside est formé d'une molécule de glucose et d'une molécule de fructose relié par une liaison osidique. Cependant d'autres sucres, de faibles poids

moléculaires sont également retrouvés à l'état de traces, tels que le glucose et le fructose (Kroplien 1974).

Des composés aromatiques se développent grâce aux réactions de Maillard. La torréfaction entraîne la dégradation des sucres, permettant la formation de furannes (Baltes et Bochmann, 1987a et 1987b ; Baltes et Mevissen, 1988). Les notes aromatiques formées sont « terreux », « Caramel », « noisette », « grillé ».

1.1.2.2.4. La trigonelline

Ce composé azoté, présent à hauteur de 0,6 à 1.2% dans la café vert, se dégrade pour moitié en acide nicotinique lors de la torréfaction (Stennert et Maier, 1994). Ce dernier, représente environ 0,02 % en MS du café torréfié.

Les composés aromatiques formés à partir de la trigonelline, lors de la torréfaction, sont des dérivés de la pyridine dont les notes aromatiques sont « vert », « grillé », « terreux », « amer », « brûlée ».

1.1.2.2.5. Les lipides

Les lipides représentent de 10 à 20 % de la matière sèche des grains verts de café. Une fraction majoritaire est constituée des composés saponifiables (acides gras et dérivés) ou non (stérols di et triterpènes, tocophérols) ou entrant dans la composition des cires (Folstar, 2001). Parmi les composés saponifiables, une grande proportion est formée de triacylglycérols. L'hydrolyse de leurs liaisons esters entre acides gras et glycérol par des bases donnent des savons (sels de Na^+ ou K^+ des acides gras) (Speer *et al.*, 1993). La même hydrolyse menée en milieu acide ou par des lipases conduit à des acides gras libres et du glycérol. A l'inverse, la deuxième fraction, très minoritaire, comporte des composés à liaison insaponifiable. Elle comprend deux diterpènes spécifiques des cafés, le cafestol et le kahwéol, et un troisième uniquement synthétisé par *C. canephora*, le 16-O-méthylcafestol. La fraction lipidique externe de la graine, extractible en traitant les grains non broyés au chloroforme, comporte essentiellement des cires, dont la composition reste très voisine de celle des lipides présents à l'intérieur des grains (Folstar, 2001).

1.1.3. La récolte et les traitements post récolte

1.1.3.1. La récolte

Quelque soit l'espèce cultivée, il est essentiel, pour tirer le maximum d'avantages de la qualité des fruits, de récolter ceux-ci au moment de la pleine maturité, dont le signe est leur couleur rouge-pourpre. La cueillette des fruits encore verts ou à peine « tournants » a des conséquences directes sur la qualité à la tasse. Elle s'opère selon plusieurs méthodes, manuelles ou mécaniques, chacune ayant des résultats très différents en matière de qualité.

Le picking : les cueilleurs ne prélèvent que les cerises arrivées à pleine maturité. Ce travail long et délicat est fait à la main en plusieurs fois car les fruits ne sont jamais mûrs en même temps. Cette technique traditionnelle offre de loin les meilleurs résultats.

Le « strip picking », la branche saisie d'une main, le cueilleur fait coulisser la totalité des fruits (sur-mûris, murs, immatures) ainsi que des feuilles, des brindilles, sans aucune différence. Les cerises immatures donneront un café sans arômes et les sur-mûries un goût désagréable.

Les méthodes mécaniques consistent à utiliser des peignes ou des vibreurs afin de faire tomber les cerises mures.

1.1.3.2. Traitements post récolte

Avant d'arriver au café vert, il est nécessaire d'enlever les membranes qui l'enveloppent et d'amener la graine à un degré d'humidité suffisamment bas pour qu'elle puisse être stockée puis transportée vers les pays consommateurs. Deux méthodes sont utilisées : la préparation par voie humide (Figure 1.5), terme générique couvrant plusieurs opérations, dont une fermentation et la voie sèche (préparation naturelle) qui prévoit le séchage au soleil des fruits entiers (Figure 1.6). Généralement le café arabica subit une préparation par voie humide, à l'exception de la plupart de la production du Brésil et de l'Ethiopie qui est obtenue par voie sèche. Le café robusta est soumis à une préparation naturelle, dite voie sèche, à l'exception d'une partie de la production de l'Inde.

Récolte

Dépulpage

Action mécanique, on sépare le grain de la pulpe.

Démucilaginage

Les grains sont entourés d'un mucilage visqueux qui est éliminé par fermentation, ou par action mécanique.

Séchage

Séchage au soleil ou artificiel. Le café est en parche

Déparchage

Avant exportation le café est déparché, on retire la parche pour le café lavé



Café
Cerise

Café
Dépulpé

Café Démucilaginé
mécaniquement ou
par fermentation

Café
parche

Café Vert

Figure 1.5 : Principales étapes du traitement du café par la voie humide

Récolte

Séchage

Séchage au soleil ou artificiel.

Décortiquage

Avant exportation le café est décortiqué, on retire la coque pour obtenir le café vert



Café
Cerise

Café
Coques

Café Vert

Figure 1.6 : Principales étapes du traitement du café par la voie sèche

1.1.3.2.1. Obtention du café vert par voies humides

Voie humide traditionnelle

Les méthodes par voie humide nécessitent une maturation uniforme des fruits, ainsi la récolte manuelle du type « picking » est la plus appropriée. Cette méthode est plus longue et comporte différentes étapes. En revanche, elle a l'avantage de donner un café de meilleure qualité organoleptique.

Flottaison

En général c'est la première étape du procédé. La récolte du jour est plongée dans de grands bacs ou cuves remplis d'eau. Les fruits mûrs, plus lourds, se concentrent au fond de la cuve. Les débris et les fruits piqués, immatures ou noirs, plus légers, flottent et sont évacués par débordement de l'eau. Ces fruits de mauvaise qualité sont traités ultérieurement par la voie sèche.

Dépulpage des cerises

La peau et la plus grande partie du mésocarpe pectiné sous-jacent du fruit mûr, la pulpe, sont éliminés par une opération mécanique, appelée dépulpage. Les cerises de café sont déversées progressivement sur les dépulpeurs qui séparent la pulpe du reste de la graine. Traditionnellement, le dépulpage était réalisé en présence d'eau, mais de nouveaux appareils fonctionnant à sec ont été développés afin de diminuer les quantités d'eau utilisées lors du procédé. Les dépulpeurs mécaniques ou électriques fonctionnent par friction de la cerise sur un disque ou un tambour (Figure 1.7).



Figure 1.7 : Dépulpage mécanique de cerises de café durant un traitement post récolte par voie humide : Dépulpeur à tambour (Venezuela)

Démucilaginage

Après le dépulpage, il reste une couche mucilagineuse adhérent au grain. Celle-ci est traditionnellement éliminée par fermentation naturelle.

Fermentation naturelle

La fermentation naturelle du café est réalisée en fermentation solide ou liquide avec immersion totale de la masse fermentaire (Figure 1.8).



Figure 1.8 : Etape de fermentation sous eau du café durant un traitement post récolte par voie humide (Venezuela)

Les fermentations sont considérées comme « aérobies » lorsqu'elles sont réalisées en milieu solide avec diffusion partielle d'oxygène au niveau des espaces interstitiels entre les grains de café. Les fermentations sont considérées « anaérobies » lorsque la masse est complètement recouverte d'eau car la diffusion de gaz est limitée. Certains auteurs conseillent de pratiquer des fermentations en deux étapes : tout d'abord une fermentation solide pour acidifier suffisamment le milieu, puis une deuxième étape sous eau afin de permettre aux changements biochimiques intrinsèques au café vert de se produire (Wootton, 1963). La durée varie de 24 à 90 h selon les conditions d'humidité, de température environnante et de maturité des

fruits. L'arrêt est décidé subjectivement lorsque la texture au toucher du tissu mucilagineux est passée de visqueuse à « crissante » sous les doigts. La sur-fermentation, donne des goûts de grains puantes par exemple, provoquant des modifications des caractéristiques biochimiques (Esters d'acides gras à chaîne courte: acétate d'isobutyle, méthyl-2 butanoate d'éthyle, méthyl-3 butanoate d'éthyle, diméthyl sulfure, diméthyl disulfure) du grain et induit le développement de mauvais goûts dans le café boisson obtenu (Barel et Jacquet, 1994 ; Menchù et Rolz, 1973).

Lavage du café

Le café est lavé dans des bains d'eau où il est agité afin de décoller les restes de mésocarpe. A cette étape, le café parche humide a une teneur en eau d'environ 55%.

La voie humide « écologique »

On estime à 40 L l'eau nécessaire pour le traitement traditionnel de 1 kg de café parche pour les étapes de lavage, de dépulpage et de transport des cerises. Ces quantités d'eau sont une catastrophe écologique car elles polluent les cours d'eaux et les nappes phréatiques. De nombreuses alternatives sont proposées pour diminuer les quantités d'eau utilisées avec des procédés comme le dépulpage sans eau et l'élimination du tissu mucilagineux par abrasion (démucilagination mécanique) (Bailly *et al.*, 1992). Cette méthode, la voie humide écologique, utilise un dépulpeur conique vertical en présence d'une faible quantité d'eau. L'élimination du tissu mucilagineux est réalisée mécaniquement par abrasion. Cependant, le fait de supprimer l'étape de fermentation microbienne entraîne des modifications physico-chimiques et organoleptiques sur le café (Puerta-Quintero, 1999).

1.1.3.2.2. Obtention du café vert par Voie sèche

Cette voie de transformation comporte une étape de séchage ; ce séchage est naturel, au soleil, ou artificiel, en séchoir plan ou rotatif (Figure 1.9). Le café ainsi préparé est appelé à ce stade café en coque ou café coque, il a une teneur en eau d'environ 12%, il peut être transporté et entreposé tel quel ou bien décortiqué et stocké sous forme de café vert. Le café ainsi obtenu est appelé café non lavé ou café naturel.



Figure 1.9 : Aire de séchage de cafés coques provenant d'un traitement par voie sèche (Venezuela)

1.1.3.3. Séchage

Le séchage est une étape critique et délicate du traitement post récolte du café. Il contribue fortement à la qualité finale du produit (Barel et Jacquet, 1994). Le café peut être séché naturellement au soleil par étalement sur des aires cimentées ou sur des claies ; il est conseillé de réaliser un séchage en couche peu épaisse, des remuages fréquents, et d'éviter la ré-humidification qui entraîne généralement l'apparition de moisissures (Figure 1.10).

Le séchage artificiel se fait dans des séchoirs plans ou rotatifs. La meilleure température pour l'air de séchage est de 45°C. Lorsque les conditions climatiques le permettent, la totalité du séchage est naturelle, ou bien naturelle suivie d'un séchage artificiel.



Figure 1.10 : Système de séchage de cafés parche provenant d'un traitement par voie humide (Venezuela)

1.1.3.4. Décorticage et déparchage

L'ultime étape pour arriver au café vert consiste à retirer la coque pour le café provenant de la voie sèche, c'est le décorticage. En ce qui concerne le café provenant de la voie humide, c'est le déparchage qui consiste à éliminer la parche. Pour ces opérations, des appareils à percussion ou des décortiqueurs constitués de palettes rotatives sont utilisés. Ceux-ci obligent le café entouré de son enveloppe à passer au travers d'une « poitrinière » perforée, d'une grille ou d'une cage à barreaux où l'enveloppe se brise.

1.1.3.5. Triage

Le café vert obtenu est ensuite soumis aux triages, granulométrique densimétrique et colorimétrique.

Le classement granulométrique permet d'obtenir des grains de même taille, ce qui facilite les triages suivants, la torréfaction, et l'élimination des défauts qui sont concentrés dans les catégories inférieures.

Le triage densimétrique permet d'éliminer les grains les plus légères (piquées, malformées, avortées, etc...), les brisures, les morceaux d'enveloppe, les grains non décortiqués, les pierres, etc. Cette opération est pratiquée à l'aide de « catadors », machines qui font un nettoyage par flux d'air ou, mieux, avec des tables densimétriques.

Le triage colorimétrique permet de séparer les grains qui ont une couleur indésirable (grains noirs, blancs ou bruns). Le triage colorimétrique peut être manuel ou électronique par analyse d'images. Le triage électronique est basé sur la mesure de la différence de réflectance entre le grain et une référence. L'utilisation de deux longueurs d'onde différentes permet d'éliminer des grains de couleurs différentes (fermentés ou pourris) qui donnent des mauvais goûts au café (Full *et al.*, 1999).

1.1.3.6. Stockage

Ce dernier stade avant la torréfaction est fondamental pour que le café vert conserve toutes ses qualités organoleptiques et sanitaires (Petraco, 2000). Pour garantir une bonne conservation, il est nécessaire de stocker un café bien sec (11-13%) avec un degré d'humidité faible (~55 à 65 % d'humidité relative à l'équilibre), conditions dans lesquelles le développement des moisissures est limité

1.1.4. La torréfaction

L'opération de torréfaction consiste à chauffer les grains de café vert à une température comprise entre 160°C et 260°C.

C'est au cours de la torréfaction que le café développe la majeure partie de ses propriétés organoleptiques. Le processus de la torréfaction consiste à griller le grain vert sous l'effet du couple temps-température. Physiquement, le grain change de couleur, il passe du vert au marron. Il peut gonfler jusqu'à 70 %, perdre jusqu'à 20% en poids. Chimiquement, la torréfaction est le siège de réactions de pyrolyse et de brunissement non enzymatique encore appelé réaction de Maillard. Cette réaction se produit entre les acides aminés et les glucides sous l'action de la chaleur ; ces

derniers se combinent pour former des composés carbonylés, des mélanoidines et des composés volatils et aromatiques

1.1.5. Préparation de la boisson

Pour préparer une bonne tasse de café, certaines conditions doivent être remplies, faute de quoi les principes qui donnent au breuvage ses qualités organoleptiques risquent d'être détruits ou volatilisés. Il existe différentes méthodes de préparation du café boisson, ce qui engendre des qualités organoleptiques différentes. Dans la préparation de la boisson, plusieurs techniques ont été développées, voici les techniques les plus souvent utilisées :

- **Le filtre**

Le filtre est vraisemblablement la méthode la plus utilisée aujourd'hui. Du café finement moulu est placé sur un cône lavable ou en papier et de l'eau sur le point de bouillir est versée par dessus. Le liquide qui s'écoule du filtre dans le pot placé en dessous est prêt à être consommé. Le filtre retient le marc de café.

- *La cafetière piston*

C'est la cafetière à piston, qui aurait été inventée en 1933, qui extrait le plus de saveur du café moulu. Le café grossièrement moulu est recouvert d'une eau frémissante, puis mélangé et laissé infuser de trois à cinq minutes avant de faire descendre le piston pour séparer le marc et l'infusion de café. Cette méthode est légèrement moins pratique que le filtre ; elle est aujourd'hui l'une des deux méthodes la plus utilisée pour préparer du café boisson.

- **La cafetière traditionnelle**

La cafetière traditionnelle est la méthode la plus simple de toutes. L'eau est versée sur le café grossièrement moulu. La méthode est similaire à celle de la cafetière à piston mais sans le côté pratique du piston qui permet de séparer le marc de l'infusion de café. La cafetière traditionnelle n'est pratiquement plus utilisée mais elle reste une méthode de dépannage.

- Espresso

Aujourd'hui, l'espresso et le cappuccino, inventés en Italie, sont les méthodes de préparation du café les plus populaires. Toutes les autres méthodes mettent en jeu une forme "naturelle" d'infusion et, pour un faible coût, produisent un café acceptable. Ce n'est pas le cas de l'espresso. Dans les machines à espresso, l'eau chaude passe à forte pression (généralement supérieure à 15 bars) au travers du café finement moulu et compacté et le breuvage ainsi produit se déverse dans la tasse. Un bon espresso est coûteux car l'extraction de la saveur du café nécessite une pression élevée et, partant, une machine perfectionnée. Pour produire un bon espresso, il est important de ne pas le noyer et d'arrêter la machine au moment opportun lorsque le liquide qui coule est encore d'une couleur brun doré. Ce liquide est la "crème" qui vient recouvrir le café.

- La cafetière Moka ou Napolitaine

Cafetière en deux parties, elle combine les caractéristiques de la machine à espresso et du percolateur. Lorsqu'elle bout, l'eau qui a préalablement été placée dans la partie basse remonte à la partie supérieure par l'intermédiaire d'un tube pour retomber sur le café finement moulu. Dans des mains expertes, elle peut produire un bon espresso en moins d'une minute

- Le percolateur

Le percolateur chauffe le café grossièrement moulu et l'eau qui, lorsqu'elle bout, passe à la partie supérieure de l'appareil.

- Café turc ou arabe

Bien que l'Arabie ait donné le café au monde, elle n'a pas propagé sa méthode de préparation. Il existe une différence fondamentale entre la méthode arabe et les autres : les Arabes font bouillir le café, traditionnellement trois fois. L'ébullition enlève les saveurs les plus délicates du café mais c'est une méthode pour préparer un café fort. Le café arabe est préparé dans un *ibrik*, petit pot en cuivre muni d'une longue poignée. On y verse deux cuillères à café de café finement moulu, une cuillère à café de sucre et une tasse d'eau puis le mélange est porté à ébullition. Au moment de

l'ébullition, l'*ibrik* est retiré du feu ; généralement, cette opération est répétée trois fois, puis le café est servi pour le boire.

- Café soluble ou instantanée

Comme les autres cafés, le café instantané est fabriqué à partir de café en grains. La première étape est la préparation de concentré de café dont l'eau est extraite, soit par chauffage, soit par pulvérisation soit par cryogénisation, pour produire une poudre ou des granules solubles. La déshydratation peut dissiper des essences de café mais celles-ci sont capturées puis réintroduites dans le café fini.

1.2. Ecologie microbienne du café

Les micro-organismes impliqués dans l'écosystème du café, de la cerise au café vert, proviennent de la microflore endogène du café et des différentes contaminations auxquelles il est soumis lors des étapes de transport, de lavage (par des eaux plus ou moins chargées microbiologiquement), des aires de séchage, de stockage. La charge microbienne dépend des paramètres physico-chimiques (températures, pH, Aw), de la composition du substrat en sucres simples et/ou polysaccharides, mais aussi de l'entretien des appareils utilisés.

1.2.1. Les différentes flores

D'après Roussos *et al* (1993), l'humidité de la pulpe favorise le développement de la microflore et le tissu mucilagineux de celle-ci est un bon substrat d'un point de vue de sa composition biochimique (Avallone, 2001b). La microflore rencontrée provient de la flore saprophyte venant du fruit, du sol, des eaux ainsi que des appareils utilisés.

Les populations microbiennes diffèrent en fonction du traitement post-récolte. Silva *et al.* (2000) ont isolé sur des cafés traités par voie sèche, plus de 764 souches microbiennes. La microflore la plus abondante durant le process voie sèche était la flore bactérienne suivie de la flore fongique puis, des levures.

Cent soixante quatre de ces isolats étaient des bactéries Gram- des genres *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Enterobacter* ou *Serratia*. Les bactéries Gram+ (191 isolats) appartenaient aux genres *Bacillus*, *Cellulomonas*, *Arthrobacter*, *Microbacter*, *Brochothrix*, *Dermobacter*, *Lactobacillus*. Les levures isolées (107) étaient des genres *Pichia*, *Candida*, *Arxula*, *Saccharomyces*. Enfin, 292 isolats de moisissures appartenaient aux genres *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Cladosporium*. D'après Silva *et al.* (2008 a, b), un taux d'humidité de 14% correspond à l'*aw* permettant le développement des moisissures (Sup. à 0,65), le genre *Aspergillus* étant le plus représenté parmi les moisissures (43% des moisissures).

La microflore rencontrée durant le traitement par voie humide diffère quelque peu de celle de la voie sèche, notamment du fait d'étapes supplémentaires de dépulpage, de fermentation et de lavage. Les espèces les plus fréquemment rencontrées parmi les bactéries lactiques sont *Leuconostoc mesenteroides* (Van Pee et Castalein, 1972), *Lactobacillus plantarum* et *Lactobacillus brevis* (Pederson et Breed, 1946). Pour les bactéries aérobies, la flore Gram - semble être prédominante (Frank *et al.*, 1965) parmi laquelle *Enterobacter* et *Escherichia* (Vaughn *et al.*, 1958), *Erwinia* et *Klebsiella* (Frank *et al.*, 1965) sont les genres majoritaires. La population levurienne augmente durant la fermentation (Masoud *et al.*, 2004) mais semble avoir un rôle limité lors de cette fermentation (Avallone, 2001b). Les levures présentes sur la cerise et pendant la fermentation, sont des genres *Pichia*, *Kluyveromyces* et *Hanseniaspora* mais diminuent durant le séchage. *Kloeckera*, *Candida*, *Cryptococcus* sont surtout présentes pendant la fermentation.

Les moisissures *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* sont présentes dès la première étape au stade de la cerise mais ne se développent pas pendant les différentes étapes du process (dépulpage, fermentation, lavage). Leur prolifération n'a lieu que durant le séchage. Au cours de la fermentation durant le procédé par voie humide, la microflore est stable durant les dix premières heures avec une prédominance des bactéries aérobies, suivies par les bactéries anaérobies puis les bactéries lactiques (LAB) et enfin les levures. La microflore est ensuite dominée par les LAB et les levures. En fin de fermentation les bactéries non acidophiles diminuent, conséquence des conditions acides du milieu. (Avallone, 2001b),

D'après Silva *et al.* (2000) la microflore de la voie humide est beaucoup plus abondante que celle de la voie sèche alors que la microflore de la voie sèche est

plus variée. Les moisissures prolifèrent plus facilement avec la voie sèche qu'avec la voie humide.

1.2.2. Etude de l'écologie microbienne par PCR-DGGE

1.2.2.1. Principe de la PCR-DDGE

Les différentes flores microbiennes peuvent être étudiées par analyse de leurs ADN. Après extraction de l'ADN microbien total d'un échantillon naturel, celui-ci est amplifié avec des amorces spécifiques des différentes microflores (séquences de l'ADNr 16S pour les bactéries, ADNr 26S pour les levures ou 28S pour les moisissures). Les ADNr amplifiés sont ensuite soumis à une DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). La DGGE permet de séparer les fragments d'ADN de même taille mais de séquences variables (compositions différentes en bases puriques et pyrimidiques) et donc d'évaluer la diversité dans une communauté complexe de micro-organismes sur la base de leur génotype.

Un échantillon d'acide nucléique est déposé sur un gel d'électrophorèse (polyacrylamide) contenant un gradient linéaire et croissant d'un agent dénaturant comme l'urée ou le formamide. Au cours de leur migration dans le gel DGGE, les 2 brins d'ADN se séparent plus ou moins rapidement en fonction de leur composition en bases AT et GC (2 liaisons hydrogènes pour A-T contre 3 pour G-C). Une résolution optimale est obtenue quand les fragments ne sont pas totalement dénaturés. Pour éviter la dénaturation totale du double brin, une structure à très haute température de fusion (très riche en GC) est associée lors de l'amplification. La PCR est alors réalisée avec l'amorce forward portant en 5' une séquence de 40 GC : le GC clamp (Sheffield *et al.*, 1989).

Deux molécules différentes peuvent avoir des brins qui ne se sépareront pas au même moment et migreront alors différemment. La molécule la plus stable migrera plus loin que celle qui se dénaturera dans le gradient. La migration des fragments d'ADN double-brin présentant des différences de séquences est ainsi ralentie, ou stoppée, à des positions variables le long du gradient de concentrations en substances dénaturantes. En fin d'analyse, les fragments stoppés sont visualisés par coloration ou marquage de l'ADN et une « empreinte génétique » de l'échantillon est obtenue. Le profil d'un échantillon se compose d'un nombre variable de bandes

horizontales disposées verticalement le long du gradient de concentrations, une bande étant théoriquement représentative d'un génotype (Figure 1.11).

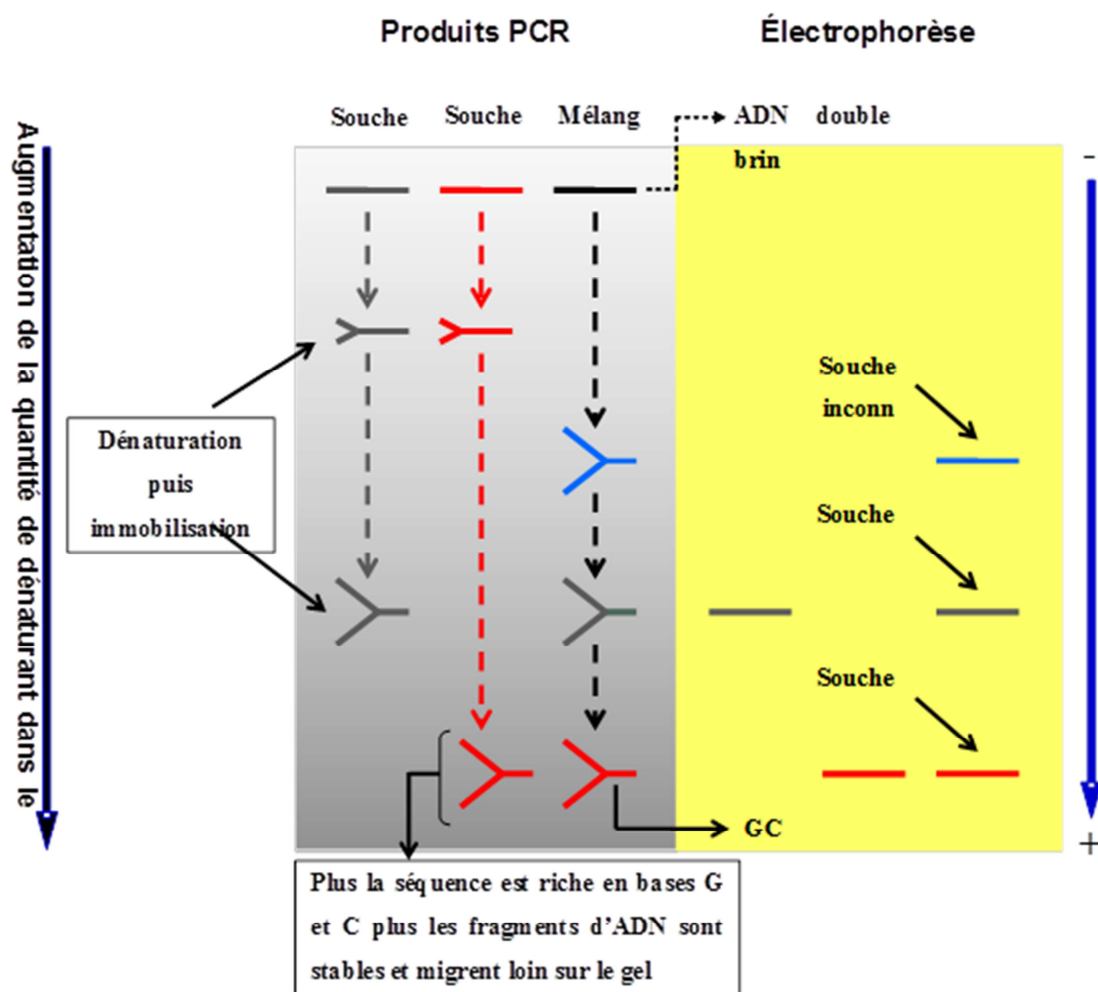


Figure 1.11 : Schéma du principe de la PCR-DGGE

1.2.2.2. Les applications de la PCR-DGGE

Depuis son introduction par Muyzer *et al.* (1993), la PCR-DGGE a été employée avec succès pour étudier les communautés microbiennes dans l'environnement. Cette technique est habituellement employée pour évaluer la diversité de la communauté et pour déterminer sa dynamique en réponse aux variations environnementales. Peu d'études ont utilisé cette technique pour caractériser la diversité des eucaryotes. Les plus récentes applications portent sur l'étude de la structure et de l'évolution des communautés des champignons de l'environnement (López-Archilla *et al.*, 2001 ; Aguilera *et al.*, 2006), du sol (Van Elsas *et al.*, 2000 ; Li

et al., 2008), de l'aérosol (Nieguitsila *et al.*, 2007), des fruits frais (El Sheikha *et al.*, 2009; El Sheikha et Montet, 2011, ; El Sheikha, 2010 ,de la rhizosphère du blé (Smit *et al.*, 1999 ; Gomes *et al.*, 2003), du compost (Marshall *et al.*, 2003), des boues (Marsh *et al.*, 1998), des picoeucaryotes marins (Díez *et al.*, 2001a,b), des rivières (Van Hannen *et al.*, 1999 ; Zettler *et al.*, 2002) ou du bois (Vainio et Hantula, 2000).

Au cours de ces dernières années, la méthode DGGE a également été utilisée pour étudier les populations de champignons dans le lait, le pain au levain (Meroth *et al.*, 2003 ; Gatto et Torriani, 2004 ; Cocolin *et al.*, 2002a.), dans le café (Masoud *et al.*, 2004. Vilela *et al.*, 2010) et les fermentations du vin (Cocolin *et al.*, 2000, 2001, 2002b; Hernán-Gómez *et al.*, 2000; Mills *et al.*, 2002; Cocolin et Mills, 2003; Prakitchaiwattana *et al.*, 2004). Cocolin *et al.* (2000) et Fernandez-Gonzalez *et al.* (2001) ont étudié la diversité des levures et des moisissures présentes au cours de la fermentation du vin. Ils montrent que la PCR-DGGE est une alternative viable aux méthodes classiques en boîtes de Pétri pour une évaluation qualitative des agents microbiens dans les fermentations de vins modèles. Dans chaque cas, les auteurs ont obtenu une excellente corrélation entre les données obtenues en boîtes de Pétri et la présence ou l'absence d'une bande en DGGE.

Nielsen *et al.* (2005) l'ont utilisé pour caractériser les populations levuriennes présentes dans le cacao fermenté ghanéen sur trois sites différents, à des périodes différentes au cours de la saison de production. Dans la même optique, Laforgue *et al.* (2009) ont ainsi montré que la PCR-DGGE a permis de suivre la dynamique des communautés fongiques présentes sur les raisins pour une détection précoce des espèces potentiellement impliquées dans les défauts du vin.

En ce qui concerne le suivi de l'écologie microbienne sur le café par PCR-DGGE, Masoud *et al.* (2004) ont suivi l'évolution de la flore levurienne durant le procédé par voie humide, ils ont estimé qu'il existe une bonne corrélation entre la microbiologie et la PCR-DGGE. Toutefois Vilela *et al.* (2010) ont jugé que si la PCR-DGGE est suffisante pour évaluer la dynamique de la communauté microbienne, il existe des différences avec la méthode traditionnelle et qu'il vaut mieux associer les deux techniques.

1.2.2.3. Les limites de la PCR-DGGE

Comme toutes les techniques moléculaires, la PCR-DGGE est elle aussi soumise à de nombreux biais qui peuvent forcément entacher l'analyse de la diversité

microbienne d'un échantillon. Ces biais peuvent intervenir à différents stades de l'analyse : lors de l'échantillonnage, de la conservation de l'échantillon, de la lyse cellulaire lors de l'extraction des ADN, de l'amplification de l'ADNr par PCR, de la migration électrophorétique sur le gel DGGE et du manque de sensibilité de la méthode pour les souches présentes en faible quantité.

Echantillonnage et conservation des échantillons

L'échantillon prélevé dans le milieu doit rendre compte le plus fidèlement possible de l'ensemble des espèces présentes dans l'environnement. Il est donc important de connaître les conditions physico-chimiques d'obtention des échantillons.

Dans le cas où il n'est pas possible de traiter (extraction d'ADN) l'échantillon dès son prélèvement, il est nécessaire de le stocker dans les conditions qui permettent de conserver l'intégrité des acides nucléiques. En effet, le lavage, le transport ou les procédures de refroidissement peuvent influencer les espèces microbiennes présentes dans l'échantillon en augmentant ou en réduisant le nombre et les espèces pouvant être détectées par la PCR-DGGE (Ercolini, 2004).

Extraction des acides nucléiques

L'extraction de l'ADN constitue une étape-clé. La première étape de l'extraction est la lyse cellulaire qui a pour effet de casser les membranes cellulaires des microorganismes en endommageant le moins possible les acides nucléiques. L'efficacité de la technique de lyse cellulaire sur un échantillon est d'autant plus difficile à déterminer que le type et la quantité de cellules microbiennes à analyser est inconnue. Toutes les espèces microbiennes n'ont pas la même sensibilité aux agents lytiques du fait des compositions différentes de leur paroi. La purification des acides nucléiques peut s'avérer difficile sur des échantillons non homogènes. Les matrices alimentaires contenant des lipides, protéines, polysaccharides et sels diminuent les rendements d'extraction et peuvent être retrouvées dans les extraits d'ADN. Ces résidus pourraient également agir comme inhibiteurs lors de l'amplification par PCR.

Amplification par PCR

L'amplification par PCR est l'une des sources majeures de biais dans l'étude de la diversité microbienne. Certains brins subissent une amplification préférentielle par PCR (Reysenbach *et al.*, 1992). Un mélange d'ADN microbien d'une communauté peut ainsi n'être que partiellement amplifié par PCR, avec pour conséquence l'obtention d'un produit dont une partie des membres originaux de la communauté est absente. Cela représente un problème pour l'analyse de la communauté microbienne par la PCR-DGGE parce que le nombre d'espèces détectées peut ne pas refléter complètement la diversité de l'échantillon.

La Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

Une des limitations de la DGGE est le gel d'acrylamide qui ne permet qu'une séparation des fragments ayant une longueur maximale de 500 paires de base (Myers *et al.*, 1985). Une identification fiable des espèces microbiennes est difficile car les séquences des bandes de DGGE qui sont comparées à celles des bases de données peuvent être identiques au sein d'un même genre microbien, d'autant plus que les séquences comparées sont courtes (236 à 256 pb dans notre cas). De plus, il n'est pas toujours possible de séparer les fragments d'ADN qui n'ont qu'une faible variation dans les séquences (Vallaey *et al.*, 1997).

La co-migration des fragments d'ADN peut être un problème pour la recherche des séquences particulières. En fait, malgré des séquences différentes, les propriétés de fusion des brins d'ADN peuvent être quelquefois identiques. Dans ce cas, les gels DGGE ne peuvent permettre la séparation des bandes (Ercolini, 2004).

Limites de la détection des moisissures

Le seuil de détection par PCR-DGGE des espèces est l'objet de controverses. Certains auteurs estiment qu'il dépend du niveau quantitatif des populations. Pour Cocolin *et al.* (2000), une population minimum de 10^4 cellules/mL de levures est nécessaire pour rendre détectable l'espèce considérée. D'autres auteurs avancent que le seuil de détection d'une espèce est fonction du rapport entre les concentrations de chaque espèce en présence. Ainsi Prakitchaiwattana *et al.* (2004) annoncent qu'un rapport de concentrations excédant 1 pour 1000 entre plusieurs espèces limite la détection aux espèces majoritaires uniquement.

1.3. Mycotoxines et ochratoxine A

1.3.1. Mycotoxines

Les mycotoxines sont des substances toxiques issues du métabolisme secondaire de certaines espèces fongiques. Elles peuvent également être définies comme des métabolites produits après l'arrêt de la réduction des groupes cétoniques pendant la biosynthèse des acides gras chez les moisissures (Gimeno, 2000). Elles ont des effets toxiques sur l'organisme humain et animal (Eskola, 2002). La toxicité peut être aiguë, chronique, mutagénique ou tératogénique. Les métabolites secondaires sont pour la plupart élaborés par famille de produits chimiquement voisins ; ceci s'explique par l'existence des « grilles métaboliques » (Bu'Lock et Jaquet, 1965). Comparativement aux autres êtres vivants plus évolués, le métabolisme secondaire est très important chez les microorganismes et aboutit à une grande diversité de molécules dont les mycotoxines. Certaines voies métaboliques servent ainsi d'exutoires permettant au microorganisme de ne pas accumuler des métabolites primaires potentiellement toxiques pour lui.

Les moisissures toxinogènes peuvent se développer sous tous les climats, sur tous les supports solides ou liquides dès l'instant qu'il y a des éléments nutritifs, de l'humidité (activité en eau A_w supérieure à 0,6), d'où la grande variété des substrats alimentaires pouvant être contaminés. En raison de leurs implications sur la santé humaine, la productivité animale et le commerce tant national qu'international, les mycotoxines sont souvent à l'origine de pertes économiques importantes. D'après la FAO, 25% des cultures vivrières de la planète sont attaquées par des moisissures productrices de mycotoxines et les pertes totales de denrées alimentaires dues aux mycotoxines sont estimées à près de 1 000 millions de tonnes par an (FAO, 2008). La contamination peut intervenir au champ lorsque les moisissures toxinogènes envahissent leur substrat et produisent la ou les mycotoxine(s) sur les plantes au niveau du champ. Elle peut également intervenir au cours du stockage lorsque les toxines sont produites après récolte.

De nos jours, parmi les 300 mycotoxines différentes qui ont été isolées et caractérisées, une trentaine possède des propriétés toxiques présentant un réel risque pour la santé humaine et animale (ANSES, 2009). Les mycotoxines peuvent être classées en polycétoacides, terpènes, cyclopeptides et métabolites azotés selon

leur origine biologique et leur structure ou encore selon leurs principaux effets toxiques. Les mycotoxines actuellement considérées comme importantes du point de vue agro-alimentaire et sanitaire sont les aflatoxines, les ochratoxines et l'ochratoxine A en particulier, la patuline, les fumonisines, la zéaralène et les trichothécènes et tout spécialement le déoxynivalénol. Dans un même groupe structural de toxines, la toxicité peut varier considérablement d'une toxine à une autre et le danger n'est pas toujours lié à la toxine elle-même, mais peut aussi provenir de ses métabolites.

Ces toxines contaminent de nombreuses denrées d'origine végétale, notamment les céréales mais aussi les fruits, noix, amandes, grains, fourrages ainsi que les aliments dérivés de ces matières premières et destinés à l'alimentation humaine et animale.

En fait, les aliments concernés peuvent être classés en deux grands groupes : les aliments et produits d'origine végétale, et par transfert ceux d'origine animale. Parmi les produits et aliments d'origine végétale, les céréales et leurs produits dérivés (y compris les produits de fermentation tels que les bières) présentent un facteur de risque important compte tenu de la fréquence de contamination et de leur consommation importante en Europe quel que soit le régime alimentaire. Les autres produits d'origine végétale sont les fruits (y compris leur jus et leurs produits de fermentation tels que les vins et cidres et leurs dérivés secs), les épices, le café et le cacao. Les produits et aliments d'origine animale tels que le lait, le sang, les abats et ainsi que leurs dérivés sont également susceptibles de contenir des traces de mycotoxines ou des métabolites des mycotoxines contenues dans les aliments ingérés par les animaux d'élevage.

Les mycotoxines qui contaminent les denrées alimentaires sont produites principalement par 5 genres de moisissures : *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* et *Alternaria* (Castegnaro et Pfohl-Leskowicz, 2002) (Tableau 1.2). Certaines moisissures sont capables de synthétiser plusieurs mycotoxines (Eskola, 2002).

Tableau 1.2 : Mycotoxines contaminant les produits alimentaires et espèces fongiques associées

Mycotoxines réglementées ou en cours de réglementation	Principales espèces fongiques	Principaux produits alimentaires contaminés
Aflatoxines	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>	Maïs, arachides, noix, coton, sorgho et autres oléagineux, lait et les produits laitiers (aflatoxine M) par l'intermédiaire d'aliments pour animaux contaminés.
Ochratoxine A	<i>A. ochraceus</i> , <i>P. nordicum</i> , <i>P. verrucosum</i> (<i>viridicatum</i>), <i>A. carbonarius</i> , <i>A. niger</i> , <i>A. alliaceus</i> , <i>A. terreus</i> <i>Penicillium verrucosum</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Aspergillus westerdijkiae</i>	Grains (surtout le blé), café, raisins et fruits, vin, bière (faits à partir de grains contaminés), viande de porc et œufs par l'intermédiaire d'aliments pour animaux contaminés.
Trichothécènes Deoxynivalenol (DON) T-2 toxine	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>Fusarium langsethiae</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. crookwellense</i> , <i>F. tricinctum</i> , <i>F. acuminatum</i> , <i>F. roseum</i>	Céréales, légumineuses
Patuline	<i>A. clavatus</i> , <i>P. cyclopium</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. granulatum</i> , <i>Byssoschlamys nivea</i> , <i>Paecilomyces varioti</i>	Pommes et produits à base de pommes
Fumonisines B1, B2, B3	<i>F. verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i>	Céréales (maïs)
Zéaralénone	<i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. semitectum</i>	Céréales, soja

	<i>F. crookwellense</i>	
Alcaloïdes d'ergot	<i>Claviceps purpurea</i> , <i>C. paspali</i> , <i>C. africana</i> , <i>C. fusiformis</i>	Céréales
Autres mycotoxines		
Acide cyclopiazonique	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>Penicillium</i> dont <i>P. camemberti</i>	Arachides, maïs et fromage
Citrinine	<i>P. viridicatum</i> , , <i>P. citreoviride</i> , <i>Monascus purpureus</i> <i>Aspergillus terreus</i> , <i>A. carneus</i> , <i>A. niveus</i> <i>Penicillium verrucosum</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. expansum</i>	Céréales et fruits
Toxines d' <i>Alternaria</i> (alternariol, alternariol méthyl éther...)	<i>Alternaria alternata</i> , <i>Alternaria solani</i>	Céréales
Stérigmatocystine	<i>A. versicolor</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A. flavus</i>	Maïs, riz, blé, foin (entreposage après récolte)

Sources : Gimeno 2000, Delage *et al.*, 2003, Bünge *et al.*, 2004, Kaniou-Grigoriadou *et al.*, 2005, Castegnaro et Pfohl-Leszkowicz, 2002, ANSES, 2009

1.3.2. Mycotoxinogénèse

Les mycotoxines sont issues du métabolisme secondaire qui n'est pas lié à la croissance cellulaire mais répond généralement à des signaux issus de l'environnement de la moisissure et qui peut être spécifique d'une espèce, voire d'une souche fongique et de ses caractéristiques génétiques. Les conditions de synthèse et d'excrétion des mycotoxines sont généralement plus restrictives que celles autorisant la croissance fongique. Les conditions optimales de la toxinogénèse

dépendent d'une combinaison de facteurs à la fois liés à la souche fongique elle-même et les facteurs qui sont constitués par l'ensemble des conditions écologiques. Les voies de biosynthèse des mycotoxines ne sont pas toutes bien élucidées. La méthode moléculaire est une méthode d'avenir (Taylor *et al.*, 1999). Le séquençage de l'ADN a permis la préparation d'amorces ou de sondes spécifiques des espèces productrices (Edwards *et al.*, 2002). La PCR, ainsi que la technique RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) ont été utilisées pour l'identification des gènes impliqués dans la biosynthèse des mycotoxines (Lopes *et al.*, 2000 ; El Khoury et Atoui, 2010).

Plusieurs types de facteurs conduisent à la colonisation fongique et à l'imprégnation mycotoxique d'une denrée : les facteurs environnementaux ou la nature du substrat notamment.

Les facteurs écophysiologiques qui affectent la mycotoxinogénèse sont d'origine physique, chimique ou biologique (Mitchell *et al.*, 2004). Ces facteurs agissent généralement en synergie (Lacey, 1986 ; Oviedo *et al.*, 2011). Les deux facteurs physiques essentiels qui influencent la croissance et la production de mycotoxines sont la température et l'humidité (Mitchell *et al.*, 2004 ; Medina et Magan, 2011)

Chaque espèce ou isolat a son niveau optimal d'humidité (ou activité de l'eau, A_w) et de température pour la production de mycotoxine. Ces optima de toxinogénèse peuvent différer sensiblement de leur optimum pour la croissance. A côté de l' A_w et la température, le pH peut avoir un effet critique pour la croissance fongique et la production de mycotoxine. La plupart des moisissures se développent sur une gamme de pH de 5,5 à 9 avec une A_w entre 0,85 à 0,98, à une température optimale comprise entre 20°C et 30°C (Reboux, 2006). Pour autant, certaines espèces comme *Wallemia sebi* peuvent se développer sur le sucre avec une A_w très basse ($A_w = 0.65$), ou comme *Penicillium roqueforti* sur le pain avec des valeurs de pH très bas (pH =3), tandis que *Aspergillus fumigatus* peut se développer à des températures élevées au-delà de 50 °C (Frisvad *et al.*, 2005). La toxinogénèse dépend fortement de l'activité en eau (A_w). Quand les autres facteurs ne sont pas limitants, la toxinogénèse croît d'une façon exponentielle avec une A_w jusqu'à un maximum puis un ralentissement de la toxinogénèse est observé dû à un défaut d'oxygénation (Sùarez-Quiroz *et al.*, 2004a). Les conditions optimales de toxinogénèse sont fonction de l'espèce et de la nature du substrat. L' A_w optimale

pour *Aspergillus ochraceus* se situe entre 0,95 et 0,99 sur des milieux riches en sucre et 0,81 sur des milieux contenant du NaCl. Elle est de 0,82 chez *A. carbonarius* et est inférieure à 0,80 chez *Penicillium verrucosum* dans les mêmes conditions (Pitt et Hocking, 1997). L'étude de l'influence de l'*Aw* sur la croissance de *Alternaria alternata* et sa production d'alternariol (AOH) et alternariol monométhyl ether (AME) sur du soja irradié a montré que la toxinogénèse était maximale pour une *Aw* de 0.98. L'*Aw* minimale (0.96) pour la production de toxines était supérieure à celle nécessaire pour la croissance (Oviedo *et al.*, 2011). Les moisissures qui contaminent les produits agricoles au champ exigent une teneur en eau plus importante dans le substrat (22-25 %) que celles qui interviennent au cours du stockage (13-18 %) (Frisvad *et al.*, 2005).

La température optimale de toxinogénèse est généralement voisine (légèrement inférieure) de la température optimale de croissance des souches productrices (Samson, 1991). *Aspergillus ochraceus* est une espèce mésophile - xérophile. Il se développe entre 8 et 37°C, avec un optimum entre 24 et 37°C. Peu d'informations sont disponibles sur *A. carbonarius* car sa capacité à produire l'OTA n'a été rapportée que récemment. Des études préliminaires récentes indiquent des conditions optimales entre 32 et 35°C (Heenan *et al.*, 1998 ; Téryen *et al.*, 1996 ; Varga *et al.*, 1996). *Aspergillus niger* se développe de façon optimale à des températures hautes, avec un optimum entre 35-37°C. *P. verrucosum*, quant à lui, est capable de croître à basse température (entre 0 et 31°C, l'optimum est à 20°C). La patuline, l'acide pénicillique et l'OTA sont élaborés à des températures généralement inférieures à celles de la croissance. Les températures optimales de croissance et de production d'aflatoxines chez *A. flavus* sont proches (Samson, 1991). Pour d'autres toxines (trichothécène et zéaralénone), la température optimale de toxinogénèse peut être jusqu'à 10°C inférieure à celle de la croissance (Samson, 1991). L'étude de l'influence de la température sur la production des toxines T-2 et HT-2 par *Fusarium langsethiae* a montré que la température optimale se situait entre 20 et 30 °C (Medina et Magan, 2011).

Dans le cas de l'OTA, plusieurs études ont été réalisées afin de déterminer l'influence de l'activité de l'eau, la température, la période de l'incubation et leurs interactions sur la croissance fongique et la production d'ochratoxine par *A. ochraceus* et *Aspergillus* section Nigri (Astoreca *et al.*, 2010) sur un milieu défini et

sur le café (Pardo *et al.*, 2005a), l'orge (Ramos *et al.*, 1998) et le raisin (Mitchell *et al.*, 2004 ; Belli *et al.*, 2004 ; Pardo *et al.*, 2005b).

Les facteurs biologiques sont liés à l'espèce fongique, à la spécificité et la variation de la souche et à l'instabilité des propriétés toxiques. Une même toxine peut être élaborée par différentes espèces qui peuvent être de genres différents. C'est notamment le cas de la patuline et de l'OTA qui sont produites par plusieurs espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium*. Une même espèce peut également produire plusieurs toxines (production d'OTA et de citrinine par *Penicillium verrucosum* ; d'OTA et d'acide penicillique par *Aspergillus ochraceus* ; d'OTA et fumonisines par *A. niger* aggregate ; de citrinine et de patuline par *Penicillium claviforme* ou *Aspergillus terreus* (Le-Bars, 1988, Chiotta *et al.*, 2011)). Au sein d'une espèce réputée toxigène, toutes les souches peuvent ne pas avoir cette propriété. La fréquence de souches toxigènes dépend de l'espèce fongique. Pour une même espèce, la production des toxines peut dépendre de la région et du substrat d'origine (Kokkonen *et al.*, 2005). La nature du substrat peut en effet influencer l'expression du pouvoir de sécrétion des toxines (Andersen et Thrane, 1996; Reboux, 2006 : Khalesi et Khatib, 2011). La toxinogénèse est plus étroitement liée à la composition chimique du substrat qu'à la croissance fongique. La biosynthèse de certaines mycotoxines peut être favorisée par la présence des glucides dans le substrat, puis des lipides et enfin les protéines qui ont une moindre influence (Pitt et Hocking, 1997). Il est important de noter que des différences dans cette expression, peuvent être observées au sein d'une même espèce et expliquer les différences de pouvoir toxigène observées entre "souches". En outre, des souches au sein d'une même espèce ne disposent pas toute du système enzymatique requis pour la production des mycotoxines (Nicholson *et al.*, 2003). Il a été montré que pour une même espèce les profils des substances produites sont différents en milieu synthétique et naturel. Ainsi, *Penicillium roqueforti*, est incapable de produire une toxine sur le lait de brebis lors de la fabrication du fromage de Roquefort, car le calcium est un inhibiteur de la production de la toxine, mais est en mesure de sécréter un métabolite très toxique in vitro (Reboux, 2006).

Des micro-organismes « de concurrence » peuvent affecter la production de mycotoxine sur les produits agricoles. Ils peuvent augmenter ou gêner la formation des mycotoxines en changeant le métabolisme de l'organisme producteur, par la

concurrence pour les substrats, en changeant les conditions environnementales, les rendant défavorables pour la production de mycotoxine, ou en produisant des composés inhibiteurs (Lacey, 1986). Les interactions avec d'autres microorganismes peuvent également être différentes dans différentes conditions environnementales (Marin *et al.*, 1998, Magan *et al.*, 2003).

Plusieurs facteurs additionnels peuvent influencer la production des mycotoxines dans le champ. Il peut s'agir des pratiques agricoles comme le labourage et la rotation de récolte (Lipps et Deep, 1991), les fongicides utilisés (Moss et Frank, 1985), la variété de la plante (Golinski *et al.*, 1996) et les différences géographiques (Langseth *et al.*, 1995). En outre la culture biologique peut poser un risque pour la production accrue de mycotoxine comme cela a été proposé par Pirgozliev (2003). L'utilisation des produits phytosanitaires sur les plantes pendant les traitements agricoles a une action préventive sur l'apparition des mycotoxines. L'emploi des pesticides protège des lésions dues aux insectes et acariens et réduit la contamination par les souches toxigènes ou la production des mycotoxines (Duris *et al.*, 2010).

1.3.3. Ochratoxine A (OTA)

L'OTA est une mycotoxine qui contamine un grand nombre de produits alimentaires tels que les céréales, la bière, le café, le cacao, les fruits secs, le raisin, le jus de raisin et le vin, les abats de porc ou de volaille et le lait (Pittet *et al.*, 1996 ; WHO, 1996 ; Blanc *et al.*, 1998 ; Hurst et Martin, 1998 ; Jorgensen, 1998 ; Skaug, 1999 ; Thirumala-Devi *et al.*, 2001 ; Miraglia et Brera, 2002 ; Mounjouenpou *et al.* 2008 ; Dachoupakan *et al.*, 2009a). L'OTA suscite une attention particulière pour ses effets néphrotoxiques, immunotoxiques, tératogènes et cancérigènes (Abarca *et al.*, 1994 ; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1999) et le Centre international de recherche sur le cancer a classé l'OTA comme cancérigène pour l'espèce humaine (groupe 2B) (IARC, 1993). A cause de sa thermostabilité et de sa résistance à l'acidité (Boudra *et al.*, 1995,), l'OTA est également retrouvée dans les produits transformés fermentés, séchés et/ou torréfiés (Chiavaro *et al.*, 2002 ; Miraglia et Brera, 2002).

1.3.3.1. Structure chimique et propriétés physico-chimiques de l'OTA

L'Ochratoxine A (OTA) a été isolée pour la première fois à partir d'*Aspergillus ochraceus* en 1965. Par la suite, elle a été identifiée comme contaminant du maïs aux USA en 1969, puis dans l'ensemble du monde (Weindenburner, 2001).

L'OTA ($C_{20}H_{18}ClNO_6$) [7-(L-β-phénylalaniyl-carbonyl)-carboxyl-5-chloro-8-hydroxy-3,4-dihydro-3R-methylisocoumarine] est une isocoumarine liée par un groupement carboxy à une L-β-phénylalanine. Son numéro de CAS est 303-47-9. La Figure 1.12 montre la structure chimique de l'OTA (Ringot *et al.*, 2005).

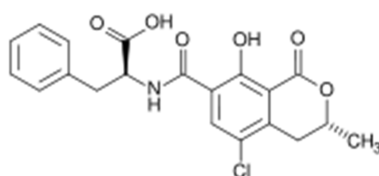


Figure 1.12: Structure de l'Ochratoxine A

C'est un solide blanc de masse molaire 403,8 g/mole, ayant un point de fusion de 90°C lorsqu'elle est cristallisée dans le xylène. Le spectre d'absorption UV de l'OTA varie avec le pH et la polarité du solvant. L'OTA possède un maximum d'absorption à 333 nm avec un coefficient d'extinction molaire de 5 500 mol/cm dans l'éthanol. Sous excitation à 340 nm, l'ochratoxine A est fluorescente, avec un maximum d'émission à 428 nm sous sa forme non ionisée et à 467 nm sous sa forme ionisée (Steyn, 1993 ; Scott, 1994 ; Jiménez *et al.*, 1999 ; Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1999).

L'OTA est un acide faible. Elle est soluble dans les solvants organiques polaires et dans des solutions aqueuses de bicarbonate sodique. Elle est partiellement soluble dans l'eau. Sous forme de sel sodique, l'OTA est soluble dans l'eau (OMS, 1990). Le pK_a du groupe de la phénylalanine est de 4,8, et celui du phénol 7,1 (Dall'Asta *et al.*, 2004).

Généralement, l'OTA est stable et peut être conservée à 4°C sous forme dissoute dans l'éthanol ou du méthanol. Plusieurs études montrent sa stabilité vis-à-vis de la température et des radiations γ quand elle est en solution dans du méthanol (Scott, 1994 ; Valenta, 1998). Pour être complètement hydrolysée, l'OTA doit subir un

chauffage sous reflux pendant 48h en présence de l'HCl 6M (Stander *et al.*, 2000) ou subir des traitements enzymatiques (Scott, 1994).

Composés dérivés de l'OTA

Différents dérivés naturels ou synthétiques de l'OTA ont été identifiés (Weindenburner, 2001). Les analogues naturels sont constitués de l'Ochratoxine B (OTB) qui est le dérivé non chloré de l'OTA, l'Ochratoxine C (OTC) qui est l'ester éthylique de l'OTA, et l'Ochratoxine α qui est le dérivé isocoumarine obtenu après l'hydrolyse de la liaison peptidique avec élimination de la phénylalanine (Harris et Mantle, 2001). Avec l'OTA, l'OTC est la plus toxique tandis que l'OTB et l'OT α sont peu toxiques. Toutefois si l'OT α est très concentrée, elle peut provoquer un échange des chromatides sœurs (Follmann *et al.*, 1995 ; Xiao *et al.*, 1996).

Les analogues synthétiques de l'OTA sont constitués de l'épimère d'OTA (d-OTA), l'éthylamide d'OTA (OE-OTA), l'OTA décarboxylée (DC-OTA), l'OTA o-méthylée (OM-OTA), et le méthylester d'OT α (M-OT α) (Xiao *et al.*, 1996).

1.3.3.2. Toxicologie de l'OTA

L'ochratoxine A est connue pour sa néphrotoxicité. Elle s'avère également immunotoxique, tératogène et neurotoxique. Son pouvoir cancérogène est établi chez l'animal, mais les preuves sont encore insuffisantes chez l'homme. Toutefois, l'OTA est classée dans le groupe 2B par l'IARC (International Agency for Research on Cancer) (1993) comme étant un cancérogène possible chez l'homme.

Le site principal d'absorption de l'OTA se situe au niveau du jéjunum. Elle est ensuite distribuée aux différents organes via le foie. Chez l'homme, l'OTA possède la plus longue demi-vie dans le plasma qui est estimée à un mois (Studer-Rohr *et al.*, 2000). La distribution tissulaire de l'OTA, chez le porc, le poulet ou la chèvre, suit en général l'ordre suivant : reins > foie et muscle > graisses. L'OTA est éliminée par toutes les voies d'excrétion (urinaire, fécale et biliaire). Dans l'organisme l'OTA est métabolisée en 4-R-hydroxyochratoxine A (4R-OHOA) ; 4-S-hydroxyochratoxine A (4SOHOA) ; 10 OH-OTA, OTB (forme déchlorée de l'OTA) ; OP-OTA (forme ouverte de l'OTA) ; OTHQ (forme quinone) pouvant être retrouvés dans le sang ou les urines sous ces

formes là ou conjugués au glutathion (Pfohl-Leszkowicz, 1999 ; Mally *et al.*, 2004 ; Faucet-Marquis, 2005 ; Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007).

Toxicité aiguë

La toxicité aiguë de l'OTA varie en fonction de l'espèce, du sexe et de la voie d'administration. La DL50 est de 30,3 mg/kg p.c. chez les rats mâles alors qu'elle est de 21.4 mg/kg p.c. pour les rats femelles. Le chien et le porc sont les espèces les plus sensibles, la souris et le rat sont les moins sensibles. Chez les rats, la DL50 par voie intraveineuse est de 12,7 mg/kg p.c., de 12,6 mg/kg p.c. par voie intrapéritonéale et de 21,4 à 30,3 mg/kg p.c. par voie orale. Le rein est l'organe cible de l'OTA (Pfohl-Leszkowicz et Castagnero, 1999).

Néphrotoxicité

Cette toxine touche surtout les reins et peut provoquer des lésions aiguës et chroniques. L'OTA est associée à l'apparition d'un nombre important de tumeurs dans les voies urinaires supérieures qui sont souvent rencontrées, mais pas exclusivement, dans plusieurs vallées des Balkans et elle serait l'un des facteurs potentiels à l'origine de troubles rénaux chez l'homme connus sous le nom de Néphropathie Endémique des Balkans (NEB). Cette corrélation a été établie par plusieurs études scientifiques (Bordas *et al.*, 1973 ; Chernozemsky *et al.*, 1977 ; Markovic, 1985 ; Castagnero *et al.*, 2006 ; Pfohl-Leszkowicz, 2009) Les signes cliniques sont ceux d'une insuffisance rénale progressive précédée par une anémie très marquée (Tatu *et al.*, 1998). L'OTA serait également responsable de désordres rénaux en Egypte et Tunisie (Creppy, 1999 ; Hassen *et al.*, 2004).

Tératogénicité

L'OTA peut traverser le placenta et provoquer des anomalies morphologiques variées chez les embryons de rat, souris, hamster, porc et poulet (El Khoury et Atoui, 2010). Les mécanismes de la tératogénicité induite par l'OTA ne sont pas encore clairement définis. Elle semble être liée à une action indirecte de l'OTA sur la mère, et à un effet direct sur le développement embryonnaire (Pfohl-Leszkowicz et Castagnero, 1999).

Immunotoxicité

Le système immunitaire semble être plus touché par l'OTA que les autres organes qui lui sont sensibles. L'OTA agit sur l'immunité humorale en induisant la régression des immuno-globulines IgG, IgA et IgM. Elle est également responsable de l'inhibition de la réponse immunitaire transmise par les lymphocytes B et T (immunité cellulaire). Des troubles au niveau de la moelle osseuse ont également été observés chez les animaux à qui l'OTA a été administrée. Au niveau immunitaire l'un des effets les plus notables de l'OTA est la diminution de la taille des organes lymphoïdes (Bondy et Pestka, 2000 ; Al-Anati et Petzinger, 2006). L'OTA agit également sur les cellules de la moelle osseuse chez la souris et chez l'homme (Boorman *et al.*, 1984 ; Froquet *et al.*, 2003). Chez le porc en croissance, l'OTA augmente le nombre de cellules sanguines totales mais diminue le pourcentage de lymphocytes (Müller *et al.*, 1999). En plus de modifier le nombre de cellules immunitaires présentes dans des tissus, l'OTA altère la fonction de ces cellules. (Chang et Hamilton, 1980 (Harvey *et al.*, 1994 ; Müller *et al.*, 1999 ; Müller *et al.*, 2003). Chez plusieurs espèces, l'exposition à l'OTA entraîne une diminution des anticorps spécifiques vis-à-vis de différents antigènes Une réduction d'IgG, d'IgA, et d'IgM a ainsi été observée dans les tissus lymphoïdes et les sérums de poulet (Dwivedi et Burns, 1984). Chez les poulets infectés expérimentalement avec une bactérie (*E. coli* O78) ou un parasite (*Eimeria tenella*) et nourris avec un aliment contaminé par l'OTA, les altérations histologiques observées sur les organes immunitaires sont plus sévères que chez les animaux non exposés à la toxine (Kumar *et al.*, 2004 ; Stoev *et al.*, 2002). L'exposition des souris à l'OTA réduit également leur taux de survie après infection expérimentale par *Pasteurella multocida* (Müller *et al.*, 1995). Enfin, chez le porc, l'ingestion d'aliment contaminé par l'ochratoxine A, entraîne l'apparition d'infection par *Salmonella Cholerae suis*, *Brachyspira hyodysenteriae* et *Campylobacter coli* (Stoev *et al.*, 2000).

Génotoxicité

L'OTA induit des cassures mono-brin de l'ADN dans différents tissus ou cellules de souris in vivo et in vitro (Creppy *et al.*, 1985). Le traitement de souris et de rats par l'OTA induit la formation d'adduits à l'ADN dans la rate, le foie et le rein (Pfohl-Leszakowicz, 1991 ; Obrecht-Pflumio *et al.*, 1996 ; Petkova-Bocharova *et al.*, 1998). Les adduits à l'ADN ont aussi été observés dans plusieurs types de cultures

cellulaires traitées avec l'OTA : cellules rénales de singe (Grosse *et al.*, 1995), cellules épithéliales bronchiques humaines (Grosse *et al.*, 1995) et cellules épithéliales porcines vésicales (Dorrenhaus et Follmann, 1997). D'autres études ont conclu que l'OTA n'est pas mutagène dans le test d'Ames (Follmann et Lucas, 2003) et n'induit pas la formation d'adduits à l'ADN chez des rats traités avec 2 mg/kg p.c. pendant 2 semaines (Mally *et al.*, 2004). L'étude menée par Turesky (2005) chez des rats mâles n'a pas montré la formation d'adduits à l'ADN. Compte-tenu de ces études, il est actuellement admis que les effets de l'OTA mesurés au cours d'études in vivo et in vitro tels que toxicité rénale régio-spécifique, lésions de l'ADN ou effets génotoxiques, seraient attribuables à un stress oxydatif cellulaire (ANSES, 2009).

Pouvoir cancérogène

L'OTA est cancérogène chez la souris avec une dose TD50 (tumorigenic dose rate 50) de 4500 µg/kg p.c./j, et chez le rat avec une TD50 de 74 µg/kg p.c./j, montrant que le rat est beaucoup plus sensible aux effets cancérogènes de l'OTA (Kuiper-Goodman et Scott, 1989). Chez l'homme, une corrélation positive entre l'exposition à l'OTA et la NEB ainsi qu'entre la distribution géographique de la NEB et l'incidence élevée des cancers de l'épithélium urothélial a été montrée (Nikolov *et al.*, 1996). Les concentrations sériques d'OTA mesurées sont plus élevées chez les patients atteints de la NEB et/ou du cancer de l'épithélium urothélial que chez les sujets non malades. L'OTA est classée dans le groupe 2B par l'IARC (International Agency for Research on Cancer) (1993) comme étant un cancérogène possible chez l'homme.

1.3.3.3. Législation sur l'OTA

Avant la publication du règlement européen 1831/2003 de l'Union Européenne, seulement 11 pays européens avaient défini des limites maximales de contamination de divers aliments par l'OTA (Van Egmond, 1999 ; WHO, 1996). Dès lors, beaucoup de progrès ont été faits dans le domaine de la sensibilisation. Les principes de base de la législation communautaire concernant les contaminants dans les aliments sont fixés par le règlement de la Communauté Economique Européenne (CEE) N° 315/93 du conseil du 8 février 1993. Le Règlement EC 1831/2003 de la commission du 26 janvier 2003 a fixé des limites maximales d'OTA dans certains aliments (Tableau 1.3). En 2006, la DHT (Dose Hebdomadaire Tolérable) a été revue à la hausse à 120

ng/kg p.c./sem par l'EFSA. Cette réévaluation se fonde notamment sur la démonstration de l'absence de génotoxicité directe de l'OTA (ANSES, 2009).

Tableau 1.3 : Teneurs maximales en OTA admises dans les aliments réglementés (Règlement CE 123/2005)

Aliment	Spécification	Limite maximale admise (µg/kg)
Céréales	Céréales en grain brut	5,0
	Produits dérivés ou transformés des céréales	3,0
Raisin	Raisins secs	10,0
	Vins et boissons à base de vin ou de moût de raisin	2,0
	Jus de raisin et boissons à base de jus de raisin	2,0
Café	Café torréfié et café torréfié et moulu	5,0
	Café soluble	10,0
Aliments pour enfants	Aliments élaboré à base de céréales	0,5
	Aliments diététiques	0,5

Actuellement, des normes sur les fèves de cacao, la bière, le café vert, les produits carnés, les fruits secs sont en cours d'élaboration dans l'Union Européenne. Ces normes pourraient être de 2 µg/kg pour les fèves de cacao, nibs (fèves de cacao décortiquée), gâteau de cacao et poudre de cacao, et de 1 µg/kg pour les produits à base de cacao (chocolat à croquer, boisson de chocolat), 10 µg/kg pour le café vert et 0,2 µg/kg pour la bière.

1.3.3.4. OTA dans l'alimentation humaine

Les aliments les plus contributeurs à l'exposition de la population française à l'ochratoxine A sont les céréales, le café, le vin, les fruits secs, la bière, le chocolat et les épices. Les données de contamination reliées à la consommation montrent que les forts consommateurs français sont exposés à 3,5 ng/kg p.c./j (20% de la DJT) pour les adultes et à 7,8 ng/kg p.c./j (45% de la DJT) pour les enfants (ANSES,

2009). Les céréales, le vin et le café sont les aliments les plus incriminés dans l'ingestion de l'OTA par l'homme. Leurs contributions à l'ingestion journalière d'OTA en Europe sont respectivement de 50, 13 et 10 % (Figure1.13).

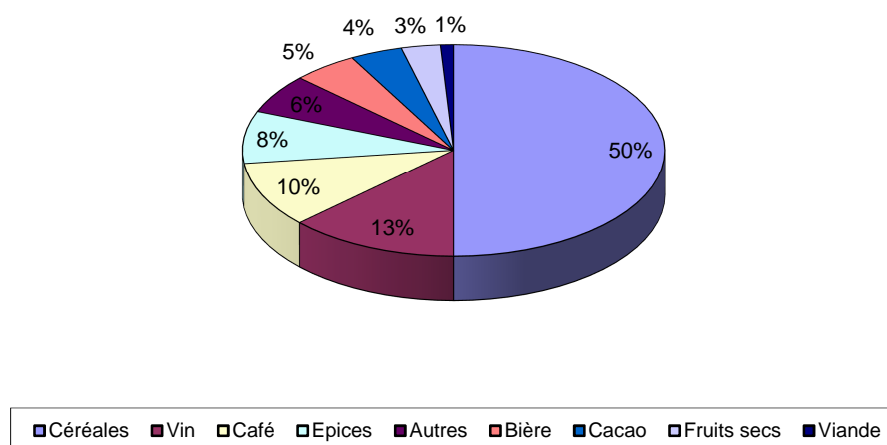


Figure 1.13 : Contribution de différentes denrées alimentaires à l'exposition moyenne de la population européenne à l'OTA (d'après Task 3.2.7, European Commission 2002).

L'OTA présente une stabilité élevée (Boudra *et al.*, 1995) et n'est que peu, ou pas, dégradée au cours des procédés de transformation des aliments (cuisson, fermentation, torréfaction...). Elle est par conséquent retrouvée dans les produits dérivés de matières premières contaminées (Miraglia et Brera, 2002) ainsi que dans la viande (Jørgensen, 1998) ou le lait obtenu à partir d'animaux ayant reçu une alimentation contaminée. Les produits animaux contaminés par l'OTA, comme la viande de porc ou de volaille, sont des sources indirectes d'OTA chez l'homme (Miraglia et Brera, 2002 ; Jørgensen, 1998 ; Micco *et al.*, 1987). Il en est de même de leurs produits transformés (saucisses, jambon, etc...) (Miraglia et Brera, 2002, Chiavaro *et al.*, 2002). En ce qui concerne les ruminants et leur lait, l'apport en l'OTA au régime humain est minimal grâce à la mycoflore de leur rumen qui dégrade partiellement l'OTA (Galtier et Alvinerie, 1976 ; Hult *et al.*, 1976). Le rapport SCOOP 3.2.7 a montré que 18% des échantillons de viande analysés étaient contaminés en OTA. L'OTA peut être transférée dans le lait, contribuant à l'exposition infantile au cours l'allaitement (Ferrufino-Guardia *et al.*, 2000). L'OTA a été retrouvée dans le lait

humain (Micco *et al.*, 1991, 1995 ; Breitholtz-Emanuelsson *et al.*, 1993 ; Zimmerli & Dick, 1995 ; Miraglia *et al.*, 1995 ; Skaug *et al.*, 1998) et dans une moindre mesure dans du lait de vache (Breitholtz-Emanuelsson *et al.*, 1993).

L'OTA est aussi retrouvée tout au long de la chaîne de transformation des céréales (Alldrick, 1996). L'OTA, présente initialement sur l'orge (Park *et al.*, 2002 ; Zinedine *et al.*, 2006), est retrouvée dans la bière (Scott & Kanhere, 1995 ; Baxter, 1996 ; Jørgensen, 1998 ; Odhav & Naicker, 2002, Tangni *et al.*, 2002). Le procédé de maltage n'a pas d'incidence sur le taux d'OTA apportée par l'orge et 80% de l'OTA du malt est retrouvée dans le moût après les étapes d'empâtage et de filtration. Toutefois, la bière ainsi produite contient moins d'OTA que l'orge. En terme de concentrations, cela équivaut en OTA de 2 à 32% de celles du grain (Nip *et al.*, 1975 ; Baxter *et al.*, 2001). Il est probable qu'une partie significative de l'OTA soit dégradée durant le brassage sous l'action d'enzymes protéolytiques (la coupure de la liaison peptidique de l'OTA la convertissant en OT α non toxique) et qu'une autre partie de l'OTA, du fait de sa faible solubilité dans l'eau reste dans le malt.

L'OTA, contaminant le blé, se retrouve dans les produits dérivés. Une analyse des céréales du petit déjeuner a mis en évidence la présence d'OTA dans 69% des échantillons testés (Molinié *et al.*, 2005) parmi lesquels 20% avait un taux supérieur à la législation en vigueur. L'OTA a également été retrouvée dans des aliments infantiles à base de céréales (Araguas *et al.*, 2005), dans les biscuits, le pain ou les pâtes (Verger *et al.*, 1999, 2005). Les parties périphériques du grain de blé, éliminées au cours du broyage, permettent de réduire de 66% le niveau de contamination en OTA dans la farine blanche, préparée à partir d'un blé propre. Par la suite, on observe encore 10% de réduction du taux d'OTA lors de la cuisson du pain blanc. Ces résultats ont été confirmés par Scudamore *et al.* en 2003, qui parvenait à obtenir une réduction de 75% du taux d'OTA dans le pain blanc en utilisant une combinaison de nettoyage, de dépelliculage et d'élimination des parties périphériques du grain de blé. Par contre, on ne constate qu'une très faible réduction du taux d'OTA au cours de la préparation de la farine complète (réduction de 10%).

L'OTA contamine fréquemment le raisin (Tjamos *et al.*, 2004) et est retrouvée dans les produits dérivés tels que le jus de raisin et le vin (Varga & Kozakiewicz, 2006). (Majerus *et al.*, 2000). Le jus de raisin est considéré comme une source d'exposition à l'OTA pour les enfants. L'OTA a été retrouvée dans 88% des jus de raisins rouges et 78% des échantillons de jus de raisins blancs avec des valeurs comprises entre

1,16 et 2,32 µg/L (Majereus *et al.*, 2000 ; Filali *et al.*, 2001 ; ANSES, 2009). Le niveau d'OTA dans les vins européens varie entre 0,01 et 3,4 µg/L. Il existe des régions spécifiques de contamination des vignobles par l'OTA. Ainsi, le bassin Méditerranéen est le plus touché ; de plus, le vin rouge serait plus concerné que le rosé ou le blanc (Burdaspal et Legarda, 1999 ; Majerus *et al.*, 2000 ; Markaki *et al.*, 2001 ; Pietri *et al.*, 2001 ; Blesa *et al.*, 2004 ; Brera *et al.*, 2005).

Parmi les dérivés du raisin, c'est dans les raisins secs que les niveaux les plus élevés ont été rencontrés, ils peuvent dépasser 40 µg/kg (Mac Donald *et al.*, 1999 ; MAFF, 1999).

Chez l'homme, des recherches d'OTA dans le sérum et le plasma (Grosso *et al.*, 2003), les reins (Petzinger *et al.*, 2000), l'urine (Domijan *et al.*, 2003) et le lait (IARC, 1993) révèlent sa présence. Des cas d'ingestion d'OTA par inhalation dans des champs contaminés ont été décrits (Petzinger *et al.*, 2002). De plus l'OTA a été détectée dans le sang d'ouvriers travaillant sans masques de sécurité dans les entrepôts de café, cacao, épices, et également dans les locaux mal ventilés (Iavicoli *et al.*, 2002 ; Sangare-Tigori *et al.*, 2006).

Le Tableau 1.4 donne la teneur en OTA dans quelques aliments.

Tableau 1.4 : Teneur en OTA dans quelques produits alimentaires

Matrice	Origine	Echantillons analysés	Echantillons positifs (%)	Moyenne (µg/kg ou L)
Céréales et produits dérivés				
- Maïs	Europe et Argentine	139	90	0,112
- Seigle	Danemark	422	61	0,651
- Riz	Espagne	77	13	0,775
- Orge	Espagne	52	63	0,198
- Blé	Danemark	419	54	0,161
- Pain au blé	Inconnu	162	100	0,271
- Bouillie	Italie	238	8	0,032
- Bière	Belgique	62	3	0,033

Vin et raisin				
- Vin rouge	Espagne	28	46	0,088
- Vin rosé	Amérique	5	20	0,015
- Vin blanc	Europe	18	22	0,013
- Raisin	Portugal	11	27	0,168
- Raisin sec	Inconnu	85	79	1,81
Café				
- Café vert	Côte d'Ivoire et Zaïre	4	100	10,9
- Café vert	Brésil	135	29	2,09
- Café torréfié	Allemagne	419	46	0,99
- Café décaféiné	Allemagne	71	37	0,49
- Café soluble	Espagne	9	100	0,500
Viande et produits dérivés				
- Viande de porc	Danemark	83	82	0,09
- Viande de poulet	Danemark	65	55	0,021
- Jambon	Italie	42	83	0,838
- Saucisses	Allemagne	201	48	0,09
	Arabie	3	33	0,357
- Fromage	Saoudite			
- lait	Norvège	87	13	?

Sources : Burdaspal et Legarda, 1998 ; Jorgensen, 1998; Burdaspal et Legarda, 1999 ; Skaug, 1999 ; Scudamore et Patel, 2000 ; Otteneder et Marjerus, 2001 ; Aboul-Enein *et al.*, 2002 ; Beretta *et al.*, 2002 ; Chiavaro *et al.*, 2002 ; Jorgensen et Jacobsen, 2002 ; Miraglia et Brera, 2002 ; Tangni *et al.*, 2002 ; Romani *et al.*, 2003 ; Taniwaki *et al.*, 2003 ; Lombaert *et al.*, 2004 ; Rosa *et al.*, 2004; Serra *et al.*, 2004 ; Gonzàlez *et al.*, 2006.

1.3.3.5. OTA et café

1.3.3.5.1. Occurrence de l'OTA dans le café et produits dérivés

Le café est l'une des boissons les plus consommées dans le monde et sa contribution à l'exposition humaine à l'OTA peut être élevée. La législation européenne a fixé une teneur maximale en OTA dans le café torréfié ($5,0 \mu\text{gkg}^{-1}$) et le café instantané ($10,0 \mu\text{gkg}^{-1}$) (European Commission, 2006) mais le niveau dans le café vert n'est pas encore réglementé.

Il y a cependant en Europe des limites nationales pour le café vert allant de $5,0 \mu\text{gkg}^{-1}$ en Finlande à $20,0 \mu\text{gkg}^{-1}$ en Grèce (European Commission, 2002, 2006; FAO, 2006).

La présence d'OTA dans le café vert est reportée depuis 1974 (Levi, Trenk, & Mohr, 1974) dans des concentrations allant de $0,2$ à $62 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Gopinandhan *et al.*, 2008; Heilmann, *et al.*, 1999; Romani *et al.*, 2000).

Depuis que Tsubouchi *et al.* (1987) ont montré la persistance de l'OTA dans le café torréfié et le café boisson, de nombreuses études ont confirmé la présence de la mycotoxine dans le café vert, torréfié (jusqu'à $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$), instantané et dans la tasse (Burdaspal et Legarda, 1998 ; Lombaert *et al.*, 2002 ; Perez de Obanos *et al.*, 2005 ; Studer-Rohr *et al.*, 1995 ; Tanikawi *et al.*, 2003 ; Mounjouenpou *et al.*, 2007).

En 2002, le groupe de coopération scientifique de la Commission européenne (SCOOP /Task 3.2.7) a publié des données sur l'occurrence d'OTA dans le café vert et les cafés manufacturés.

Six pays ont fourni des données sur le café vert ($N = 1\,704$; 36 % d'échantillons positifs), avec la contribution de l'Europe du Nord ($N = 1\,096$) et de l'Europe du Sud ($N = 608$). La teneur moyenne en OTA (calculée pour tous les échantillons) était de $1,620 \mu\text{g.kg}^{-1}$ pour l'ensemble de l'Europe avec des teneurs plus élevées en Europe du Sud ($2,290 \mu\text{g.kg}^{-1}$) qu'en Europe du Nord ($1,248 \mu\text{g.kg}^{-1}$). Une différence plus élevée a été observée pour la teneur moyenne calculée pour les échantillons positifs avec $3,641 \mu\text{g.kg}^{-1}$ pour l'ensemble de l'Europe, $2,681 \mu\text{g.kg}^{-1}$ pour l'Europe du Nord et $6,376 \mu\text{g.kg}^{-1}$ pour l'Europe du Sud.

Concernant les cafés manufacturés, tous les pays ont fourni des données sur le café torréfié et certains ont également fourni des données pour d'autres types de café (Europe : $N = 1\,184$; 46 % positifs ; Europe du Nord : $N = 862$; 51 % positifs ;

Europe du sud : N = 322 ; 34 % positifs). La teneur moyenne en OTA (calculée pour tous les échantillons) était de $0,724 \mu\text{g.kg}^{-1}$ pour l'ensemble de l'Europe avec des teneurs plus élevées en Europe du Nord ($0,749 \mu\text{g.kg}^{-1}$ qu'en Europe du Sud ($0,656 \mu\text{g.kg}^{-1}$). La teneur moyenne calculée pour les échantillons positifs était de $1,092 \mu\text{g.kg}^{-1}$ pour l'ensemble de l'Europe, $0,971 \mu\text{g.kg}^{-1}$ pour l'Europe du Nord et $1,582 \mu\text{g.kg}^{-1}$ pour l'Europe du Sud.

Le nombre total des données a été considéré comme suffisant pour évaluer le problème de contamination du café par l'OTA. Il a été confirmé que le café vert est une matière première particulièrement sensible à la contamination par l'OTA. Il a donc été recommandé de mettre en pratique des mesures préventives pour diminuer la contamination par la toxine dans les pays producteurs. Le taux d'échantillons positifs plus élevé pour le café manufacturé que pour le café vert (46 % contre 36 %) laisse penser que les plans d'échantillonnage dans le café vert sont à améliorer. La forte différence observée entre les cafés verts et manufacturés ($6,376 \mu\text{g.kg}^{-1}$ vs $1,582 \mu\text{g.kg}^{-1}$ pour l'Europe du Sud) est probablement imputable à la réduction plus importante de l'OTA pendant la torréfaction plus poussée pratiquée dans en l'Europe du Sud (Castellanos-Onorio *et al.*, 2011). La pratique des mélanges de café pour obtenir différents goûts (variétés d'Arabica et Robusta) peut aussi être responsable de cette différence.

Les niveaux de contamination du café par l'OTA varient par rapport aux différentes régions d'origine. Cette différence est attribuée aux conditions climatiques de chaque région et aux traitements post-récolte utilisés. En général, tous les cafés lavés et non lavés provenant d'Amérique Centrale et du Sud ont une faible teneur d'OTA. Des taux plus élevés ont été observés dans le café des pays qui produisent des cafés Robusta ou Arabicas non lavés. Cependant, ces observations ne peuvent pas exclure la possibilité que la contamination par l'OTA peut se produire à la dernière étape en raison de mauvaises conditions de transport et de stockage (Heilman *et al.*, 1999).

1.3.3.5.2. Estimation de la consommation d'OTA à partir du café

L'estimation de la consommation en OTA (European Commission, 2002, Task 3.2.7) a été faite à partir des produits consommés (torréfiés, instantanés, décaféinés). Elle variait de 0,06 ng/kg p c /j en Italie à 0,42 ng/kg p c /j en Finlande. Les différences au sein d'une même population étaient inférieures à 0,1 ng/kg p c /j. Le café contribue donc à hauteur de 0,5-3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de poids corporel par semaine et l'ingestion moyenne d'OTA est estimée à 25 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de poids corporel par semaine toutes sources confondues pour un adulte français fort consommateur (ANSES, 2009). Ainsi, le café qui a été considéré comme une importante source d'OTA dans le régime alimentaire chez l'homme sur la base de sa fréquence est un contributeur beaucoup moins important parce qu'il est responsable seulement de 5-6 % de l'ingestion d'OTA en Europe (FAO/WHO, 2001a ; Pitt, 2001)

1.3.3.6. Moyens de maîtrise de la contamination par l'OTA

Deux stratégies, prévention et décontamination, sont utilisées pour limiter la présence ou la croissance des moisissures ochratoxinogènes et réduire la teneur en OTA des produits alimentaires sensibles tels que les céréales, le café ou le raisin et leurs produits dérivés.

1.3.3.6.1. Prévention

La prévention, qui est à privilégier (Mounjouenpou *et al.*, 2008), réside actuellement essentiellement dans l'utilisation de bonnes pratiques agricoles.

Pré-récolte

L'utilisation de pesticides pour limiter les moisissures ou les attaques dues aux insectes qui favorisent la contamination par les souches ochratoxinogènes (Wagacha et Muthomi, 2008) contribue à limiter la présence d'OTA. Ainsi, une étude récente sur du café kenyan (Duris *et al.*, 2010) a permis d'identifier 6 types de défauts, d'origine agronomique ou dus à une polyembryonie ou d'un manque de soins au cours des traitements post récolte. Les défauts d'origine agronomique, grains endommagés par les insectes et grains attaquées par *Colletotrichum kahawae*, moisissure responsable de l'anthracnose des baies, sont les plus fréquents, avec une forte prédominance de grains atteintes d'anthracnose. Les symptômes d'anthracnose sur les cerises indiquent que l'intégrité du fruit n'a pas pu être

préservée, facilitant ainsi l'installation de champignons saprophytes et potentiellement toxigènes. Dans les conditions de l'étude, les grains saines comptent respectivement pour 75,3 % et 64,9 % du poids total des grains de café parche et de café coque et la contamination par l'OTA des grains saines reste faible (0,2 µg/kg pour le café parche et 0,4 µg/kg pour le café coque) alors qu'elle atteint respectivement 8,8 et 10,3 µg/kg lorsque les grains présentent des défauts. Les grains défectueuses contribuent ainsi à plus de 95 % à la contamination d'un lot de café, quelles que soient les méthodes utilisées pour le traitement post-récolte. Les grains présentant des défauts d'origine technologique sont faiblement contaminées alors que les grains attaquées par l'anthraxose apparaissent comme la contribution majeure de la contamination par l'OTA du café. La comparaison de la teneur en OTA des grains saines et endommagées par l'anthraxose montre que ces dernières sont toujours statistiquement plus contaminées : respectivement 1,2 et 18,0 µg/kg quels que soient la méthode de traitement post-récolte, le système de production ou la zone de culture. Parmi les grains touchés par l'anthraxose ceux de café coque sont significativement plus contaminés que ceux du café parche (respectivement 29,7 et 10,6 µg OTA/kg). Cette différence peut s'expliquer par le fait que les grains les plus contaminées proviennent de cerises traitées par voie sèche (café coque) (Pérez de Obanos *et al.*, 2005), et montrerait ainsi l'influence du traitement post-récolte (Bucheli *et al.*, 2000 ; Paulino de Moreas et Luchese, 2003 ; Urbano *et al.*, 2001). Il faut toutefois nuancer cette analyse dans la mesure où les cerises les plus endommagées étant transformées en café coque, il est normal de retrouver une contamination plus forte dans ce type de café puisque les grains attaqués sont généralement plus contaminés que les grains sains. Lorsque l'utilisation d'intrants chimiques phytosanitaires est très faible, voire inexistante, ce qui est le cas chez les petits producteurs, la protection des cerises contre l'anthraxose n'est pas assurée. Dans ce cas, les teneurs en OTA des grains endommagées par l'anthraxose (29,3 µg/kg) et celles des grains saines (1,2 µg/kg) sont significativement différentes, ce qui n'est pas le cas lorsque des traitements fongicides sont réalisés (4,3 µg/kg contre 1,2 µg/kg). Il semblerait que les fongicides utilisés contre *Colletotrichum kahawae* aient une action fongistatique vis-à-vis des moisissures ochratoxinogènes. L'élimination du défaut participant le plus à la contamination moyenne des lots, en l'occurrence l'anthraxose des baies, ramènerait leurs teneurs en OTA à 1,0 µg/kg pour le café parche et 6,4 µg/kg (café coque) contre 9,2 µg/kg et 12,0 µg/kg (Duris *et*

al., 2010). Il semble donc que, dans ce cas, une bonne protection phytosanitaire, qui diminuerait l'apparition de défauts, serait favorable à l'obtention de café de meilleure qualité en termes de sûreté alimentaire (Bucheli *et al.*, 2000).

La lutte biologique

Différents **traitements biologiques** ont été décrits pour limiter la production d'OTA pendant la phase qui précède la récolte ou les traitements ultérieurs. Ceux-ci reposent sur l'utilisation d'éliciteurs qui sont des molécules naturelles exogènes. Ces molécules stimulent les mécanismes de défense des plantes en mimant une attaque pathogène (Bent and Mackey., 2007; Pare *et al.*, 2005). Les éliciteurs sont principalement des oligo et polysaccharides, peptides et glycolipides d'origines diverses. Le méthyl jasmonate est ainsi utilisé sur la vigne pour prévenir les attaques par les pathogènes fongiques responsables de l'oïdium (Belhadj *et al.*, 2006). Les chitosanes ont également montré leur potentiel pour induire une résistance des feuilles de vignes contre la pourriture grise due à *Botrytis* (Trotel-Aziz *et al.*, 2006).

Cependant, très peu de traitements ont été décrits pour limiter la production d'OTA durant la phase pré récolte. Une étude a été entreprise sur des pieds de vigne traités avec un éliciteur biologique des défenses naturelles des plantes dérivé du fenugrec (FEN 560) et comparés avec des pieds traités chimiquement. Le traitement au FEN 560, qui est efficace contre le mildiou (Martinez *et al.*, 2002), a montré un effet contre les souches ochratoxinogènes de la vigne, résultant en une réduction de la teneur en OTA des jus de raisin (Dachoupakan *et al.*, 2009a;b). Un maximum de réduction de 80% a été atteint pour des jus issus de grappes traitées biologiquement de la variété Cabernet qui est la plus touchée par la contamination par l'OTA (Dachoupakan *et al.*, 2009a;b). Le FEN 560 a également montré son efficacité sur le pathosystème *Coffea arabica/Colletotrichum kahawae in vitro* (Durand *et al.*, 2009). Dans ce cas la relation avec la réduction de l'OTA dans les cerises de café est indirecte dans la mesure où il a été montré au Kenya que les grains attaqués par *Colletotrichum kahawae* étaient les plus contaminés par les souches toxigènes et donc responsables des forts taux d'OTA (Duris *et al.*, 2010). L'utilisation d'huile essentielles et resveratrol a permis de prévenir le développement et la production d'OTA par les souches contaminant les céréales durant le stockage (Aldred *et al.*, 2008; Magan and Aldred, 2007). Le resveratrol, qui est un inhibiteur de la lipoxygénase et de la cyclooxygénase, a montré un effet de régulation de la biosynthèse de l'OTA sur la

vigne contaminée par des souches ochratoxinogènes (Reverberi *et al.*, 2010; De Rossi *et al.*, 2012).

L'utilisation de la biocompétition avec des souches non toxigènes est aussi une stratégie utilisable. Il peut s'agir de souches d'*Aspergillus niger* aggregate non productrices ou de *Penicillium* dont la présence inhibe notamment l'accumulation d'OTA pendant le séchage du raisin (Valero *et al.*, 2007). Une souche d'*Aureobasidium pullulans* a été efficacement utilisée sur la vigne pour réduire l'accumulation d'OTA et les attaques fongiques dues à *Aspergillus* (De Felice *et al.*, 2008). L'étude de l'influence de certaines levures sur la croissance et la sporulation des moisissures ochratoxinogènes a montré un impact sur la production d'OTA. Celle d'*A. westerdijkiae* est réduite au niveau transcriptionnel par la présence de *Debaryomyces hansenii* (Gil-sera *et al.*, 2011a). D'autres études réalisées in vitro ou in situ (Gil-Serna *et al.*, 2009 ; Ramos *et al.*, 2010) avec cette levure et d'autres telles que *Kluyveromyces*, *Pichia* ou des levures épiphytiques ont mis en évidence une inhibition de la croissance d'*A. carbonarius*, *niger*, *ochraceus* et *westerdijkiae* sur la vigne (Bleve *et al.*, 2006 ; Ponsone *et al.*, 2011) et le café (Masoud et Kaltoft, 2006 ; Velmourougane, 2011a). L'inoculation en milieu liquide d'assemblages de levures et bactéries, isolées de produits d'origine animale ou végétale, conjointement à *A. carbonarius* a montré l'efficacité des levures pour inhiber la croissance de la moisissure alors qu'aucun assemblage bactérien n'a été actif sur ce point (Kapetanakou *et al.*, 2012). Toutefois, un effet antifongique de bactéries lactiques isolées d'ensilage de pulpe de café a pu être mis en évidence vis-à-vis d'*A. carbonarius* (Djossou *et al.*, 2011). Des souches de *Bacillus*, isolées de graines de soja fermentées, ont également montré leur capacité à inhiber la croissance de *A. flavus* et d'*A. westerdijkiae* (Petchkongkaew *et al.*, 2008).

Récolte

Les conditions de récolte, et notamment une récolte à maturité une fermentation contrôlée, un séchage rapide et un décorticage avec des équipements et un environnement propres permettent de limiter la contamination des matières premières végétales (

Paulino de Moreas et Luchese, 2003 ; Amezqueta *et al.*, 2005 ; Wagacha et Muthomi, 2008). Le délai entre la récolte et le traitement des cerises influence également la contamination du café par l'OTA (Velmourougane *et al.*, 2011b).

Post-récolte

Lors de la phase post récolte, le stockage et le transport doivent se faire dans des conditions contrôlées de température ($<20^{\circ}\text{C}$) et d'humidité ($<10\%$ ou $A_w < 0.7$) pour éviter le développement fongique tout en évitant les contaminations croisées dues à l'utilisation de matériel contaminé (Amezqueta *et al.*, 2009).

1.3.3.6.2. Décontamination

Traitements de transformation

Les traitements de transformation permettent de réduire la teneur en OTA des produits finis à base de céréales, café, cacao ou raisin (Scudamore *et al.*, 2003 ; Delage *et al.*, 2003 ; Amezqueta *et al.*, 2005 ; Ratola *et al.*, 2005). Durant la vinification, l'élimination de 42 à 54% de l'OTA a ainsi été obtenue dans des vins rouges et blancs (Anli *et al.*, 2011).

L'influence des différents traitements intervenant jusqu'à la préparation de la boisson sur la contamination du café par l'OTA a fait l'objet de nombreuses études. La présence d'OTA dans les grains de café peut être mise en relation avec les conditions de traitements post-récolte (Bucheli *et al.*, 2000 ; Romani *et al.*, 2000 ; Suárez-Quiroz *et al.*, 2005a ; Suárez-Quiroz *et al.*, 2005b), en particulier au cours du traitement par voie sèche (Bucheli *et al.*, 2002 ; Urbano *et al.*, 2001) mais également avec les conditions de torréfaction (Suárez-Quiroz *et al.*, 2005b ; Ferraz *et al.*, 2010) ou de décaféinisation (Heilmann *et al.*, 1999). Au moment de la récolte, lorsque les cerises ne sont pas attaquées par les insectes ou l'anthracnose, elles ne sont pas ou peu contaminées par l'OTA (Bucheli *et al.*, 2000 et Taniwaki *et al.*, 2003). Ceci est probablement dû au fait que les cerises à l'état humide ne sont pas sujettes à une prolifération de moisissures ochratoxinogènes. En effet, les cerises sont à ce stade protégées de la contamination par les souches d'*Aspergillus* par la flore microbienne naturelle du café. Cette flore, mieux adaptée à de forts taux d'humidité, est constituée de bactéries, levures et souches fongiques appartenant essentiellement aux genres *Penicillium*, *Mucor*, *Cladosporium* et *Aspergillus* (Suarez-Quiroz *et al.*, 2004b). Lors du traitement des cerises par voie humide, le dépulpage limite la croissance des moisissures car celui-ci élimine un substrat de choix pour leur développement. Par la suite, le procédé mécanique avec l'élimination de la couche

externe potentiellement riche en toxine réduit la contamination en OTA. Par contre, le procédé fermentaire, plus humide et plus long, peut favoriser le développement des moisissures et ainsi la contamination par l'OTA. Le déparchage élimine lui aussi une partie de l'OTA par la perte d'une nouvelle couche externe (Suarez-Quiroz *et al.*, 2005a). La durée et les conditions du procédé de traitement par voie sèche sont compatibles avec le développement de la flore fongique, entraînant une production accrue d'OTA. Durant toute l'étape de séchage les conditions sont en effet adaptées au développement des moisissures toxino-gènes : température, humidité et substrat riche (pulpe) (Le Bars, 1988 ; Suarez-Quiroz *et al.*, 2004a). Par la suite, le décorticage entraîne cependant l'élimination d'une partie de l'OTA par la perte de la couche externe des grains. Il faut cependant noter que ce qui vient d'être décrit n'est valable que dans la mesure où toutes les protections naturelles (parches, coques) sont intactes. Toute perforation de ces protections par des insectes ou attaques fongiques est susceptible de permettre la pénétration des moisissures toxino-gènes dans la fève et par conséquent la production d'OTA au sein même du grain. L'OTA est stable aux températures habituelles de cuisson et n'est pas dégradée dans le blé à plus de 20% après un traitement de 160 min à 100°C en chaleur sèche ou 32 min à 150°C en chaleur humide (Boudra *et al.*, 1995). Toutefois, les températures élevées utilisées pour la torréfaction du café engendrent une destruction supérieure de la toxine. Auparavant, il était accepté que l'OTA était détruite durant la torréfaction. Toutefois, des nombreuses études sur l'impact de la torréfaction ont montré des niveaux de réduction allant de 0-12% à 90-100% (Amezqueta *et al.*, 2009). Les données concernant la dégradation de l'OTA sont donc très disparates. Les techniques analytiques (Mounjouenpou *et al.*, 2007) ou les conditions de torréfaction peuvent être mises en cause. Les modes de contamination des grains verts diffèrent dans les différentes études de manière naturelle ou artificielle, en inoculant des souches toxino-gènes ou en ajoutant de l'OTA. Il en résulte des niveaux de contamination souvent éloignés des conditions réelles et des problèmes d'hétérogénéité dans la distribution de la toxine. Les essais sont également parfois réalisés dans des conditions expérimentales éloignées des pratiques industrielles (Van der Stegen *et al.*, 2001; Suarez-Quiroz *et al.*, 2005b). Les études concernant les cinétiques de dégradation de la toxine pendant la torréfaction ou comparant différentes techniques sont encore rares (Suarez-Quiroz *et al.*, 2005b ; Ferraz *et al.*, 2010 ; Castellanos-Onorio *et al.*, 2011). La dégradation de l'OTA a lieu en 2 phases

dans un torréfacteur cylindre (Suárez-Quiroz *et al.*, 2005b ; Castellanos-Onorio *et al.*, 2011) alors qu'elle se déroule en une seule phase dans les torréfacteurs à lit fluidisé ou projeté (Ferraz *et al.*, 2010 ; Castellanos-Onorio *et al.*, 2011). En ce qui concerne l'efficacité comparée des deux types de procédés, le torréfacteur cylindre est plus performant au final pour la réduction de l'OTA que le lit fluidisé. En effet, même si la vitesse de dégradation est plus élevée dans le dernier cas, le temps de traitement est également beaucoup plus court (au maximum 15 min dans le cylindre contre 4 min dans le lit fluidisé). La diffusion thermique est donc insuffisante pour obtenir un niveau de réduction convenable dans tout le grain (Castellanos-Onorio *et al.*, 2011). La tendance actuelle à diminuer le degré de torréfaction du café afin d'en préserver les propriétés antioxydantes est donc en contradiction avec une détoxification efficace par rapport à l'OTA. Le procédé de solubilisation assure une réduction de 20% de la teneur résiduelle après torréfaction, portant ainsi à 13% la teneur résiduelle en OTA dans la poudre de café soluble par rapport à celle du café vert (Blanc *et al.*, 1998). Lors de la réalisation du café en boisson, la totalité de l'OTA est extraite à partir du café soluble (Van der Stegen *et al.*, 1997). A partir des grains torréfiés moulus, l'ampleur de l'extraction est variable selon les procédés de types « expresso », « moka » et « filtre » avec respectivement 49%, 32% et 14% de réduction dans la tasse (Perez de Obanos *et al.*, 2005), montrant une diminution liée à la température et à la nature de l'extraction : percolation, décoction ou infusion.

Méthodes physiques et chimiques

Peu de traitements permettent de réduire efficacement la teneur en OTA et ceux-ci ont souvent un impact sur la valeur nutritionnelle des produits alimentaires ou présentent une toxicité (Jard *et al.*, 2011).

L'ozonation, étudiée pour le procédé Oxygreen® sur les céréales contaminées par l'OTA (Canadas, 2006), permet de réduire la contamination microbienne et la toxine mais produit des effets secondaires par la formation d'adduits de l'ADN. Le traitement par l'ozone a par ailleurs montré des résultats prometteurs pour détoxifier les produits contaminés par les mycotoxines comme les fruits secs (Karaca, 2010).

L'utilisation des rayons γ , en fonction de la dose appliquée, permet de réduire et même éliminer les contaminants fongiques (Bhat *et al.*, 2010) et d'obtenir une

détoxification de 51 à 96% dans le maïs et les pois chiches (Aziz *et al.*, 2004) et de 52 % de l'OTA dans le poivre noir (Jalili, 2010).

Diverses méthodes chimiques ont montré leur efficacité sur le cacao et le raisin par traitement alcalin (élimination de 98% de l'OTA dans le cacao et disparition sur le raisin) ou le poivre (Amezqueta *et al.*, 2008 ; Serratosa *et al.*, 2010 ; Jalili *et al.*, 2011).

La détoxification à l'aide d'adsorbants minéraux donne des résultats variables qui dépendent beaucoup de la nature de l'adsorbant, des conditions de pH et de son affinité pour l'OTA. En fait, peu d'agents liants sont utilisables pour l'OTA (Schatzmayr, 2006 ; EFSA, 2009). Charbon activé, bentonite, montmorillonite, cholestyramine, zéolithes, chitosanes, caséinates ont été testés et notamment dans le vin (Amezqueta *et al.*, 2009 ; Jard *et al.*, 2011). Le chitosane et la montmorillonite ont permis d'éliminer 60 à 100% d'OTA dans le vin (Kurtbay, 2008). Une décontamination de 87% de l'OTA a été obtenue dans du vin blanc traité avec du charbon activé (Var *et al.*, 2008) mais ce dernier n'a pas montré plus d'efficacité que les autres agents clarifiants dans d'autres cas (Anli *et al.*, 2011). Dans la bière, les adsorbants les plus prometteurs semblent être le charbon et les gels de silice modifiée avec des rétentions allant de 64 à 96% de l'OTA (Belajova *et al.*, 2007). Toutefois, dans la bière comme dans le vin ces traitements altèrent la qualité organoleptique des produits (Amezqueta *et al.*, 2009).

Méthodes biologiques

En raison du peu d'efficacité des méthodes physiques et chimiques, l'attention s'est portée sur l'utilisation d'agents biologiques pour leur spécificité et afin de limiter l'impact des traitements sur la valeur nutritionnelle (Jard *et al.*, 2011). La décontamination biologique des produits alimentaires peut être obtenue par 2 voies souvent concomitantes avec différents types de microorganismes. Ceux-ci peuvent en effet dégrader et/ou adsorber l'OTA et ainsi détoxifier les produits contaminés ou limiter l'ingestion de la toxine Cela implique une attention particulière à porter sur la non-toxicité des produits formés et l'innocuité des organismes utilisés (Abrunhosa, 2010).

La principale voie de biodégradation est la transformation de l'OTA en OT α et phénylalanine non toxiques pour les microorganismes. Les enzymes impliqués qui

ont pu être identifiés sont des carboxypeptidases, lipases, protéases ou métalloprotéases d'*A. niger*, *Phaffia rhodozyma* ou *S. cerevisiae* (Abrunhosa *et al.*, 2006 ; Abrunhosa *et al.*, 2007 ; Péteri *et al.*, 2007).

Si des exemples de dégradation de l'OTA peuvent être trouvés dans tous les groupes microbiens, les phénomènes d'adsorption sont plutôt décrits pour les levures, bactéries et spores fongiques.

Moisissures

Un certain nombre de souches fongiques ont été décrites comme capables de dégrader l'OTA en OT α . Parmi celles-ci, et parallèlement à son activité biocompétitive sur la vigne, *Aureobasidium pullulans* a transformé l'OTA in vitro et dans des moûts de raisin (De Felice, 2008). Différents isolats de *Rhizopus* ont également montré leur potentiel en milieu synthétique et sur blé (Varga *et al.*, 2005). *Botrytis cinerea* a réduit la teneur en OTA d'environ 25 % dans un jus de raisin synthétique (Valero *et al.*, 2008). La bonne capacité de biodégradation de l'OTA en OT α par les moisissures du genre *Aspergillus*, et plus particulièrement celles de la section Nigri, est fréquemment rapportée. Une souche d'*A. niger* a notamment dégradé complètement l'OTA (2.5 ppm) en 5 et 7 jours en milieu synthétique solide et liquide respectivement (Varga *et al.*, 2000). Parmi les souches fongiques isolées du raisin portugais, les *Aspergillus* de la section Nigri se sont montrés les plus efficaces en dégradant jusqu'à 95% de l'OTA initialement présente dans le milieu de culture (Abrunhosa *et al.*, 2002). Une autre étude a montré que des souches de *A. carbonarius*, *A. niger* aggregate et *A. japonicus* isolées de raisin français pouvaient transformer plus de 80% de l'OTA en milieu synthétique (Bejaoui *et al.*, 2006). Il faut toutefois noter qu'*Aureobasidium pullulans* est maintenant rapportée comme pathogène pour l'homme (Chan *et al.*, 2011), ce qui compromet son utilisation pratique.

La décontamination de jus de raisin naturel et synthétique par des spores vivantes et thermiquement détruites d'*A. carbonarius*, *A. niger* aggregate et *A. japonicus* relèverait dans un premier temps de phénomènes d'adsorption sur les parois des spores puis d'une biodégradation avec le développement mycélien (Bejaoui *et al.*, 2005).

Levures

Certaines études font état de la capacité de souches de *Saccharomyces* à réduire de 66 à 100% de l'OTA en milieu synthétique contenant 1,1 ppb mais sans préciser le mécanisme mis en jeu (Caridi *et al.*, 2006a). Toutefois, une autre étude réalisée par les mêmes auteurs durant la vinification en blanc de moûts naturellement et artificiellement contaminés par l'OTA a montré une diminution de 68 et 78% respectivement de la toxine dans les vins produits et une forte teneur en OTA dans les lies levuriennes résultantes (Caridi *et al.*, 2006b). Des résultats similaires ont été obtenus lors de la fermentation de moûts contaminés à 2 ppb : jusqu'à 52 % et 70% de réduction de l'OTA dans les vins blancs et rouges respectivement et une concentration plus importante en OTA dans les lies de la fermentation en rouge (Cecchini *et al.*, 2006). Ces résultats sont en faveur d'un mécanisme d'adsorption de l'OTA sur les parois levuriennes mettant en jeu les différents constituants pariétaux des levures tels les glucanes, glucomannanes, mannanooligosaccharides ou mannoprotéines (Ringot *et al.*, 2005 ; Shetty et Jespersen, 2006 ; Nunez *et al.*, 2008 ; Abrunhosa, 2010). Différents essais ont été réalisés en présence de parois levuriennes ou cellules détruites thermiquement ou par acidification. Ainsi, dans des jus de raisin synthétiques et naturels contaminés par l'OTA et inoculés avec des souches œnologiques vivantes ou prétraitées (à la chaleur ou à l'acide) et des préparations commerciales de parois levuriennes, les cellules prétraitées thermiquement se sont montrées plus efficaces que les vivantes, posant l'hypothèse d'une potentialisation des sites d'adsorption par le traitement thermique (Bejaoui *et al.*, 2004). Une étude sur l'influence du vieillissement du vin a montré des performances supérieures des parois levuriennes par rapport aux cellules entières dont la capacité de rétention de l'OTA diminuait au cours du temps, performances encore améliorées par un traitement thermique préalable (Nunez *et al.*, 2008). Des cellules vivantes et détruites par la chaleur de *Phaffia rhodozyma* ont également montré des potentialités d'adsorption significative de l'OTA en milieu synthétique, également supérieures pour les cellules traitées thermiquement (Péteri *et al.*, 2007). Une étude réalisée avec *Debaryomyces hansenii* ne montre pas de différence de réduction de l'OTA par adsorption entre cellules vivantes et détruites par la chaleur mais met l'accent sur l'influence des pH bas qui créeraient un état d'ionisation favorable à l'adsorption de la toxine sur les constituants pariétaux (98% de réduction

à pH3) (Gil-sera *et al.*, 2011a). Des réductions de 65% de l'OTA en milieu synthétique (50 ou 100 ppb) et 12 à 32 % dans différentes boissons (100 ppb) ont été obtenues avec des assemblages de levures isolées de produits fermentés. Les mécanismes mis en jeu restent à clarifier mais la réduction de l'OTA a été significativement influencée par les paramètres physico-chimiques (pH ou concentration en OTA) et biologiques (nature des souches constituant l'assemblage levurien ou densité cellulaire) est apparu (Kapetanakou *et al.*, 2012).

Parallèlement à ce mécanisme d'adsorption, des souches de *Rhodotorula*, *Cryptococcus*, *Trichosporon* et plus particulièrement *T. mycotoxinivorans* ont montré leur capacité de dégradation de l'OTA (Schatzmayr *et al.*, 2003 ; Molnar *et al.*, 2004 ; Schatzmayr *et al.*, 2006). *Phaffia rhodozyma* a également dégradé en OT α 90% de 7,5 ppm d'OTA en milieu synthétique en 2 semaines à 20°C (Péteri *et al.*, 2007). L'enzyme responsable de la dégradation de la toxine serait une carboxypeptidase-métalloprotéase, constitutive de la cellule et non excrétée. Cette capacité de dégradation est aussi décrite chez *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia guilliermondii* et *Rhodococcus erythropolis* in vitro et une dégradation de l'OTA (7.5 ppm) à plus de 80% a été obtenue avec *Metschnikowia pulcherrima* mais ni OT α ni phénylalanine n'ont pu être mises en évidence, ce qui suggère un mécanisme de dégradation différent (Patharajan *et al.*, 2011). Il faut cependant noter que *T. mycotoxinivorans* a été récemment identifié comme un pathogène respiratoire potentiel pour l'homme (Hickey *et al.*, 2009; Ntougias *et al.*, 2010).

Bactéries

Le potentiel de décontamination de l'OTA par les bactéries met en jeu lui aussi des mécanismes d'adsorption qui sont particulièrement décrits pour les bactéries lactiques (LAB) (Shetty et Jespersen, 2006). Le phénomène est dépendant des paramètres expérimentaux comme le pH ou la concentration en toxine ou en cellules et spécifique aux différents isolats (Fuchs *et al.*, 2008). Différents essais ont été réalisés in vitro avec différentes souches œnologiques ou non de LAB. Des performances atteignant 97% de réduction de 0,5 ppb d'OTA après 4h à 37°C et pH 5 ont été obtenues avec une souche de *Lactobacillus acidophilus* (Fuchs *et al.*, 2008). Des études mettant en œuvre des souches de *Lactobacillus* et *Oenococcus oeni* ont montré une meilleure efficacité de *Oenococcus oeni* avec des réductions de

28 et 50 % de l'OTA (Del Prete *et al.*, 2007 ; Mateo *et al.*, 2009). Dans le premier cas, 57 % de l'OTA a été retrouvé dans la biomasse bactérienne et aucun mécanisme de dégradation n'a pu être mis en évidence. Toutefois, le fait que la réduction soit plus efficace avec des LAB vivantes suggère l'intervention d'une conversion métabolique mettant en jeu des enzymes spécifiques (Fuchs *et al.*, 2008).

Une réduction de 25 % de l'OTA en milieu synthétique (50 ou 100 ppb) et 2 à 8 % dans différentes boissons (100 ppb) a été obtenue avec des assemblages de bactéries, et notamment des LAB, isolées de produits fermentés sans toutefois que les mécanismes mis en jeu soient élucidés (Kapetanakou *et al.*, 2012).

La dégradation de l'OTA a été mise en évidence avec un certain nombre de genres bactériens (Abrunhosa *et al.*, 2010). Une souche de *Bacillus licheniformis* isolées de graines de soja fermentées a notamment dégradé en OT α 92.5 % de l'OTA présente en milieu synthétique (5 ppm) en 2 jours à 37°C (Petchkongkaew *et al.*, 2008). Parmi les souches de *Rhodococcus*, *Pseudomonas* et *Brevibacterium* testées en milieu liquide synthétique enrichi en OTA, tous les isolats du genre *Brevibacterium* ont transformé in vitro 40 ppm d'OTA (40 ppm) en OT α en 10 jours à 30°C (Rodriguez *et al.*, 2011). Une souche anaérobie du genre *Eubacterium*, déjà identifiée antérieurement parmi les genres bactériens détoxifiant l'OTA (Schatzmayr *et al.*, 2006), isolée de la microflore intestinale de porc, a permis de réduire de 75 % l'OTA en 24h en milieu liquide (100 ppb) et en milieu solide à base de maïs (1 ppm) à 39°C (Upahaya *et al.*, 2012). Comme déjà proposé par Péteri *et al.* (2007) pour la levure *Phaffia rhodozyma*, l'enzyme responsable de la dégradation de la toxine serait constitutive de la cellule et non excrétée.

1.3.4. Moisissures productrices de l'ochratoxine A

Les moisissures sont des champignons microscopiques, filamenteux, du règne des mycètes. Les moisissures sont des eucaryotes, hétérotrophes et saprophytes. Elles sont aérobies, et sont généralement acidophiles. Par rapport aux autres micro-organismes, les moisissures ont en général un besoin en eau faible et peuvent se développer sur des aliments à faible Aw (jusqu'à 0,65) (Guiraud, 1998). Elles sont dotées de propriétés lytiques importantes (cellulolytique, pectinolytique, amylolytique,

protéolytique, lipolytique...) qui en font des agents de dégradation importants. Elles peuvent également être utiles (affinage des fromages, production d'enzymes). Le métabolisme fermentaire des moisissures est soit aérobie avec production d'acides organiques (citrique, gluconique, oxalique...), soit semi-aérobie (fermentation lactique ou alcoolique). Certaines moisissures sont capables de produire des métabolites secondaires dont les mycotoxines.

1.3.4.1. Espèces fongiques productrices d'OTA

L'OTA est produite dans les produits végétaux par des moisissures appartenant au genre *Aspergillus* sections *Circumdati* et *Nigri* et au genre *Penicillium*. La répartition des espèces dépend des substrats et des conditions environnementales. L'OTA est ainsi essentiellement produite par les *Aspergillii* dans les zones tropicales et par des *Penicillia* dans les régions tempérées (Pitt *et al.*, 2000; Abrunhosa *et al.*, 2001; O'Callaghan *et al.*, 2003). Toutefois il existe encore de nombreuses incertitudes quant à l'identification de certaines souches et de nombreuses révisions taxonomiques ainsi que la description de nouvelles espèces ont été faites (Samson *et al.*, 2006 ; Frisvad *et al.*, 2004).

Les *Aspergillus*, sous-genre *Circumdati*, section *Nigri* sont un groupe qui renferme un nombre important d'espèces, et dont la classification et l'identification sont très discutées. La taxonomie de cette section a été très étudiée et récemment revue (Abarca *et al.*, 2004). L'espèce *A. carbonarius* et celle du groupe d'*A. niger* aggregate constituent les principaux producteurs d'OTA. *A. carbonarius* a été décrite comme productrice d'OTA depuis 1996 (Téren *et al.*, 1996). La majorité des isolats (60-100 %) sont producteurs quand ils se développent en culture pure (Battilani *et al.*, 2002, Tjamos *et al.*, 2004). L'intensité de production d'OTA est variable selon les souches (Heenan *et al.*, 1998 ; Taniwaki *et al.*, 1999). *A. niger* a aussi été décrite comme productrice d'OTA (Abarca *et al.*, 1994 ; Heenan *et al.*, 1998 ; Taniwaki *et al.*, 2003) mais sa production est peu commune car seuls 1 à 3 % d'isolats produisent en culture pure. Récemment, deux nouvelles espèces du groupe d'*A. niger* aggregate : *A. lacticooffeatus* et *A. sclerotioniger* ont été décrites comme productrices d'OTA (Samson *et al.*, 2007).

L'OTA est également produite par un nombre limité d'*Aspergillus*, sous genre *Circumdati*, section *Circumdati*. Cette section est bien connue pour sa production

d'OTA et son rôle dans la contamination du café par l'OTA (Levi *et al.*, 1974 ; Gallaz et Stalder, 1976 ; Levi, 1980 ; Tsubouchi *et al.*, 1984 ; Tsubouchi *et al.*, 1985 ; Studer-Rohr *et al.*, 1995 ; Mantle et Chow, 2000 ; Taniwaki *et al.*, 2003 ; Ahmad et Magan, 2003 ; Batista *et al.*, 2003 ; Martins *et al.*, 2003 ; Suarez-Quiroz *et al.*, 2004b). Le rôle prépondérant donné sur ce point à *Aspergillus ochraceus* a été remis en question lorsque de nombreux isolats de cette espèce ont été réidentifiés en *Aspergillus westerdijkiae* (Bacha *et al.*, 2009; Frisvad *et al.*, 2004; Samson *et al.*, 2006; Taniwaki *et al.*, 2003). Frisvad *et al.* (2004) ont en effet mis en évidence différents niveaux de production d'OTA dans ce groupe : une forte production par les espèces *Aspergillus cretensis*, *A. flocculosus*, *A. pseudoelegans*, *A. roseoglobulosus*, *A. westerdijkiae*, *A. sulphureus* et *Neopetromyces muricatus*, une production plus faible par *A. ochraceus* and *A. sclerotiorum* et une production sous forme de traces par *A. melleus*, *A. ostianus*, *A. petrakii* et *A. persii*. Parmi ces souches, les plus importantes concernant la contamination des produits alimentaires sont *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* et *A. steynii* et le résultat de cette étude est qu'*Aspergillus westerdijkiae* et *Aspergillus steynii* se sont avérées plus productrices qu'*Aspergillus ochraceus*, longtemps considéré comme le principal responsable de la présence d'OTA dans le café (Taniwaki *et al.*, 2003 ; Urbano *et al.*, 2001) et comme un contaminant important du raisin et des céréales (Bellí *et al.*, 2004 ; Refai *et al.*, 1996). Une étude récente a montré pour la première fois que *A. steynii* pouvait produire l'OTA à des niveaux supérieurs à ceux de *A. westerdijkiae* tandis qu'*A. ochraceus* et *A. elegans* produisaient peu ou pas du tout (Gil-Serna *et al.*, 2011b). Ces résultats mettent en évidence le risque potentiel lié à la présence d'*A. steynii* et *A. westerdijkiae* qui sont de forts producteurs d'OTA et contaminent une grande variété de produits alimentaires.

P. verrucosum a été d'abord l'unique espèce des *Penicillium* qui a été décrite comme étant productrice d'OTA (Filtenborg *et al.*, 1996). *P. verrucosum* est une espèce qui se développe lentement sous toutes les conditions mais il est capable d'avoir une croissance aux faibles activités de l'eau (< 0,80) et à basse température (entre 0 et 31°C, optimum à 20°C). La capacité de *P. verrucosum* de se développer à basses températures fait qu'il est apparemment consigné aux régions froides. Les principaux habitats de cette espèce sont les céréales cultivées dans les zones tempérées d'Europe du Nord et Centrale et du Canada. *P. nordicum* est plutôt adapté à des

milieux riches en NaCl et en protéines comme certains fromages et viandes fumées et séchées (Cabanès *et al.*, 2010 ; Schmidt-Heydt *et al.*, 2012).

1.3.4.2. Souches productrices d'OTA dans le café

De nombreuses espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium* qui ont été trouvées en association avec le café sont potentiellement capables de produire l'OTA mais la présence de la toxine dans le café est maintenant essentiellement attribuée à 5 espèces : *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*, depuis qu'il a été différencié du précédent, et *A. steynii* (Frank, 2001 ; Taniwaki *et al.*, 2003 ; Frisvad *et al.*, 2004 ; Noomim *et al.*, 2008 ; Gil-Serna *et al.*, 2011b)

La distribution des espèces d'*Aspergillus* est très variable en fonction de l'origine géographique du café, de l'espèce cultivée (*Canephora* ou *Arabica*) et des traitements du café. D'une manière générale, dans différentes études (Bucheli *et al.*, 2000 ; Bucheli et Taniwaki, 2002 ; Leong *et al.*, 2007 ; Noomim *et al.*, 2008), l'espèce la plus fréquemment rencontrée est *A. niger* mais elle est peu productrice : seulement 3 % ont été trouvés producteurs d'OTA dans 408 échantillons de café provenant de 4 régions de Brésil, 13 % faiblement producteurs dans du café vert de Thaïlande et aucun producteur parmi les 98 isolats de café vert vietnamien. *A. carbonarius* est également en général bien représenté et est un producteur majoritaire (de 77 à 100 % des isolats sont producteurs). *A. ochraceus* et *A. westerdijkiae* sont diversement représentés et la production d'OTA est réservée à cette dernière espèce. *A. steynii* est rencontré minoritairement mais s'avère producteur d'OTA.

1.3.4.3. Identification des souches toxigènes

Les moisissures sont identifiables par des techniques classiques d'observation culturelles, morphologiques et microscopiques. Les caractères cultureux (vitesse de croissance apicale et radiale, couleur des colonies, couleur du milieu, texture et aspect de la surface) sont essentiellement étudiés sur un milieu solide coulé en boîte de Pétri et ensemencé par touche. Plusieurs milieux de culture plus ou moins sélectifs ont été développés afin de pouvoir différencier les espèces (PDA, DG18, MEA-B, CYA, CREA, Czapek) (Samson *et al.*, 2004). L'examen microscopique

permet d'étudier la présence et le type des spores sexuelles (zygospore, basidiospore...), des spores asexuées (présence de conidiophore, morphologie de la conidiogénèse...), les hyphes cloisonnées ou non, le mycélium diffus, épais, coloré ou incolore ou la présence des sclérotés (Guiraud, 1998).

Si ces techniques d'identification, basées sur le phénotype, permettent une orientation d'identification, celles-ci restent souvent incertaines et l'approche moléculaire est de nos jours très utilisée et indispensable dans la classification des moisissures, notamment celles productrices de l'OTA. Grâce à la PCR, l'étude génotypique de nombreuses souches fongiques a été réalisée. Les principales techniques moléculaires utilisées pour l'étude du polymorphisme des ADN sont la PCR-RFLP, la PCR-AFLP, la RAPD-PCR ou le séquençage d'une région cible de l'ADN.

La PCR utilise des amorces plus ou moins spécifiques ciblant des séquences variables selon les objectifs. Elle est basée sur l'utilisation d'une polymérase thermostable qui est la *Taq* polymérase et consiste à amplifier spécifiquement un fragment d'ADN afin de le rendre détectable par électrophorèse.

Dans les dix dernières années, diverses méthodes ont été développées pour identifier et différencier par PCR les principales souches mycotoxinogènes et notamment les souches productrices d'OTA (El Khoury et Atoui, 2010).

Le ribotypage utilise des primers spécifiques complémentaires de séquences bien localisées de la région ITS1/ITS2 de l'ADN ribosomal. Cette technique permet de différencier certains *Aspergillus* noirs (Haugland and Vesper, 2002 ; Gonzalez-Salgado *et al.*, 2005). S'il est facile d'identifier *A. carbonarius*, il n'est pas aisé de différencier les autres *Aspergillus* noirs, notamment les *A. niger* agg. En effet une quasi-similitude de la partie ciblée du primer Rev de la séquence ITS₂ peut être constatée chez plusieurs espèces comme *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. brasiliensis*, *A. foetidus*, *A. lacticoffeatus*, *A. costaricaensis*, et *A. vadensis* qui sont classées comme appartenant au groupe *A. niger* agg selon Samson *et al.* (2007). De même, des similitudes de séquences sont obtenues chez les espèces unisériées *A. aculeatus*, *A. japonicus*, *A. uvarum*. Il est ainsi difficile de différencier ces espèces par ce type d'amplifications. Une technique susceptible de les différencier pourrait être le séquençage et la comparaison des fragments amplifiés.

Il est aussi possible d'utiliser pour cibles des séquences de gènes spécifiques à un ou plusieurs produits comme celui de la calmoduline (Perrone *et al.*, 2004 ; Susca *et*

al., 2007a,b ; Varga *et al.*, 2007) ou de la β tubuline (Samson *et al.*, 2004 ; Varga *et al.*, 2007).

L'étude des gènes de biosynthèse des mycotoxines est également utilisée pour identifier les souches productrices. Le séquençage du génome des moisissures a révélé l'existence d'un grand nombre de gènes PKS (PolyKetide Synthase) impliqués dans la biosynthèse de plusieurs mycotoxines et autres métabolites secondaires (Galagan *et al.*, 2005 ; Yu *et al.*, 2005). Cinq gènes PKS différents ont été identifiés chez *A. ochraceus* par Varga *et al.* (2003) et Edwards *et al.* (2002). O'Callaghan *et al.* (2003 ; 2006) ont décrit des gènes *pks* et *p450-B03*, codant pour une polyketide synthase et cytochrome *p450* monooxygénases chez *A. westerdijkiae* (anciennement *A. ochraceus*). Ils ont montré que la régulation de la production d'OTA se situait au niveau transcriptionnel et que l'expression de ces gènes pouvait être corrélée avec la teneur en OTA dans le milieu.

En fonction des moisissures et des régions cibles, des amorces spécifiques ont été trouvées. Chez *A. ochraceus*, la séquence AoLC35-12 (accession nb:AY583208) est impliquée dans la voie de biosynthèse de l'OTA Atoui *et al.*, (2006) et Dao *et al.* (2005) ont mis au point 2 types d'amorces spécifiques AoLC35-12L/AoLC35-12R et AoOTAL/AoOTAR à partir d'AoLC35-12. La paire d'amorces AoOTAL/AoOTAR détecte spécifiquement *A. ochraceus* par PCR. Toutefois, comme *A. ochraceus* et *A. westerdijkiae* n'ont été que récemment distingués en 2 espèces différentes, l'amplification avec cette paire d'amorces ne permet pas de les différencier. La seconde paire AoLC35-12L/AoLC35-12R permet quant à elle de détecter *A. carbonarius*, *A. melleus*, *A. ochraceus*, *A. sulfureus*, *P. verrucosum*, producteurs d'OTA et *P. citrinum* et *Monascus ruber*, producteurs de citrinine.

Chez *A. carbonarius*, 5 différentes séquences (AcKS9, AcKS10, Ac12RL3, AcLC35-4 et AcLC35-6) ont été identifiées par Atoui *et al.* (2006) et la détection obtenue avec les amorces dérivées de AcKS10 (Selma *et al.*, 2008) et Ac12RL3 (Atoui *et al.*, 2007) s'est montrée hautement spécifique des souches d'*A. carbonarius*.

La RFLP-PCR (Restriction Fragment Length Polymorphism) est une technique qui permet d'amplifier une région de taille variable chez différentes espèces et de digérer l'amplicon obtenu par différentes enzymes de restriction. L'identification est basée sur un critère de taille, qui témoigne du polymorphisme de restriction. L'inconvénient de la méthode est qu'il faut travailler sur des colonies isolées car

l'application à des mélanges microbiens conduit à des profils électrophorétiques trop confus. Les produits de restriction des différentes espèces peuvent se superposer et se confondre. Someren *et al.* (1991) utilisent la RFLP avec comme régions cibles *peIA*, *peIB*, *pki* pour distinguer *A. niger* et *A. tubingensis*. Lorsque la région cible est le mtDNA, cette technique peut permettre de différencier *A. niger* et *A. brasiliensis* de *A. tubingensis*, et *A. japonicus* de *A. aculeatus* (Varga *et al.*, 1993, 1994 ; Hamari *et al.*, 1997). La RFLP a également permis de distinguer les espèces *A. japonicus*, *A. vadensis* et *A. aculeatus* lorsque les régions cibles sont *peIA*, *pki*, et rDNA (Parenicova *et al.*, 2001, De Vries *et al.*, 2005).

La RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) est basée sur une amplification aléatoire de fragments d'ADN par des amorces non - spécifiques de 10 paires de bases. Si les deux sites d'hybridation sont suffisamment proches, et de position convenable, l'amplification PCR est possible. Une variabilité dans la séquence des sites entre individus sera détectée par un polymorphisme du nombre et de la longueur des fragments d'ADN amplifiés. C'est une technique facile à mettre en œuvre. L'inconvénient est la grande sensibilité de la technique. La flexibilité, le nombre de paires de bases des amorces utilisées et des conditions d'amplification contraignantes limitent la reproductibilité de la méthode (Olive et Bean, 1999). La RAPD-PCR a été utilisée par plusieurs auteurs pour l'étude de la variabilité génétique des *Aspergillus* noirs : *A. aculeatus* peut être différencié de *A. japonicus* (Hamari *et al.*, 1997), *A. brasiliensis* des autres *A. niger* agg (Varga *et al.*, 2000), *A. carbonarius* IN7 des autres isolats d'*A. carbonarius* (Kevei *et al.*, 1996).

L'AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) est une technique également basée sur l'amplification spécifique par PCR de fragments de restriction issus de la digestion de l'ADN génomique. C'est une combinaison de la RFLP et de la RAPD. L'ADN est d'abord digéré par des enzymes de restriction. Par la suite, des adaptateurs sont fixés sur les deux bouts des produits de digestion. Une amplification sélective par PCR est effectuée à l'aide d'amorces qui s'hybrident avec les adaptateurs. Cette technique est très efficace car le polymorphisme est révélé rapidement et facilement. L'AFLP a été utilisé avec succès pour différencier tous les *Aspergillus* noirs décrits (Perrone *et al.*, 2006 a et b ; Serra *et al.*, 2006 ; Varga *et al.*, 2007). Schmidt *et al.* (2004) utilisent également cette technique pour identifier les *A.*

carbonarius isolés des grains de café. L'AFLP, comme la RFLP ont permis de séparer 3 espèces des *Aspergillus* noirs : *A. carbonarius*, *A. tubingensis*, *A. niger* et le groupe des *Aspergillus* noirs unisériés (Bau *et al.*, 2006, Perrone *et al.*, 2006 a et b).

Le séquençage est une technique basée sur la méthode dite de terminaison de chaîne décrite par Sanger *et al.*, (1977). C'est l'une des techniques performantes pour l'étude du polymorphisme. Il peut concerner des régions cibles de l'ADN ou bien le génome entier (ce qui est difficile à mettre en œuvre car le séquençage du génome entier est très onéreux, difficile et très long). Le séquençage de diverses régions de l'ADN ribosomal, notamment les régions ITS1 / ITS2 et des régions D1 / D2 permettent une identification rapide et objective (Hinrikson *et al.*, 2005). La comparaison des séquences des diverses régions aux données disponibles dans les banques de données a permis d'obtenir des homologies allant de 91,9 % à 99,6 % pour la région D1 /D2, de 57,4 % à 98 % pour la région ITS1 et de 75,6 % à 98,3 % pour la région ITS2 (Hermosa *et al.*, 2001).

2. Matériels et méthodes

2.1. Matériel végétal

Les échantillons de café utilisés dans cette étude ont 3 origines différentes : Amérique Centrale (Mexique), Amérique du sud (Venezuela) et Afrique de l'ouest (Cameroun).

2.1.1. Café du Mexique

Tous les échantillons de café (1 kg) de type arabica, ont été prélevés durant le dernier trimestre 2009, dans 4 fincas (fermes ou exploitations) de la région de Veracruz (Figure 2.1 et Tableau 2.1).

Le café est cultivé dans 12 états du Mexique mais la production du pays est concentrée dans les états du Chiapas, Veracruz, Puebla et Oaxaca, qui représentent 94% de la production et 85% de la superficie de production. Le café arabica traité par voie humide représente 85% de la production totale, l'arabica traité par voie sèche représente 12%, et le reste (3%) est du robusta traité par voie sèche.

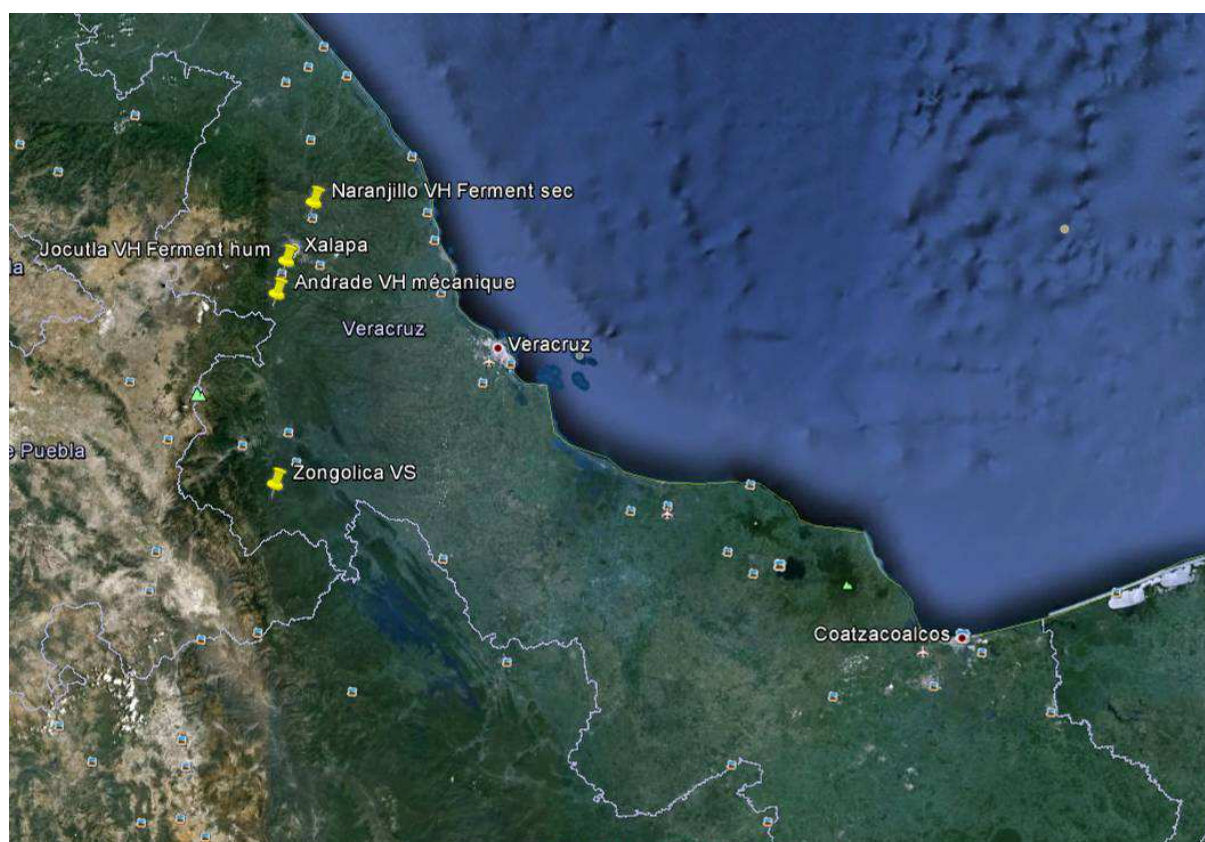


Figure 2.1 : Situation géographique des lieux de prélèvements du café au Mexique : Fincas Jocutla, Andrade, Zongolica. Province de Vera Cruz.

Le climat est identique pour les fincas Andrade et Jocutla. Il est du type tempéré humide avec des températures annuelles moyennes oscillant entre 17 et 20°C et une pluviométrie annuelle moyenne allant de 1700 à 2000 mm/an. Le climat de la finca Zongolica est plus chaud et humide, de type semi-chaud et humide avec une température annuelle moyenne variant de 14 à 26°C et une pluviométrie annuelle moyenne de 2440 à 3100 mm/an.

La qualité de la récolte et le traitement post récolte sont dans tous les cas en agrément avec les bonnes pratiques recommandées par la FAO (2001b).

Pour les fincas Andrade et Jocutla, le café est traité par voie humide, mais avec quelques variantes (Tableau 2.1). Pour la finca Zongolica le traitement est du type voie sèche.

Tableau 2.1 : Données géographiques et techniques des lieux de récolte des échantillons au Mexique.

Ref	Finca	Lieu	Date récolte	Altitude	Type de traitement	GPS	
VHA	Andrade	Cosautlan, Veracruz	12/2009	1050	Voie humide mécanique	19°19'32.4 4 " N	96°59'33.73" O
VHJ	Jocutla	Coatepec, Veracruz	12/2009	1230	Voie humide fermentation sous eau	19°27'12.7 3 " N	96°57'56.52" O
VS	Zongolica	Zongolica, Veracruz	10/2009	1227	Voie sèche	18°39'56.2 3 " N	96°59'44.81" O

2.1.2. Café du Cameroun

Les échantillons de café (*Coffea arabica* et *Coffea robusta*) ont été récoltés pendant les campagnes caféières de 2009 et 2010 dans les régions de l'Ouest (Bafoussam, Dschang et Bafang) et dans la plaine du Littoral (Santchou, Melong) au Cameroun (Figure 2.2 et Tableau 2.2). Ces régions fournissent plus de 75 % de la production nationale, soit en moyenne 80 000 tonnes de café marchand par an.

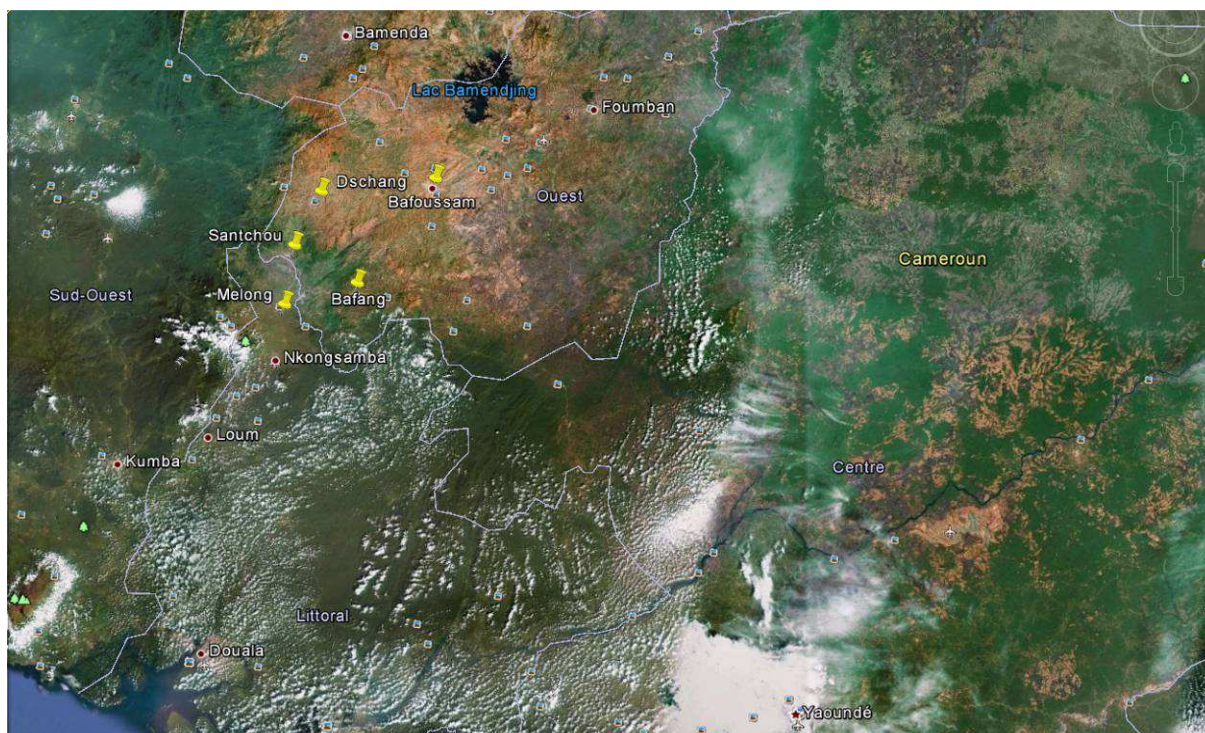


Figure 2.2 : Situation géographique des lieux de prélèvements du café au Cameroun : Bafoussam, Dschang, Bafang, Melong, Santchou.

Tableau 2.2 : Données géographiques et techniques des lieux de récolte des échantillons au Cameroun

Site	GPS		Altitude (m)	Variétés et type de traitement
Bafoussam	5°29'08,35" N	10°24'46,72" E	1397	<ul style="list-style-type: none"> • Arabica voie sèche et humide • Robusta voie sèche
Dschang	5°26'59,19" N	10°03'59,7" E	1385	<ul style="list-style-type: none"> • Arabica Voie sèche et humide • Robusta voie sèche
Bafang	5°09'54,06" N	10° 10'43,20" E	1171	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Robusta voie sèche
Melong	5°07'21,96" N ;	9°57'07,55" E ;	840	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Robusta voie sèche
Santchou	5°16'59,95" N	9°58'59,93" E	720	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Robusta voie sèche

Le climat tropical de montagne de l'Ouest est de type soudanien et a deux saisons (sites de Dschang, Bafang et Bafoussam) : une saison sèche qui va de novembre-décembre à mai-juin, une saison des pluies qui commence en juin-juillet jusqu'en

novembre-décembre. La température moyenne est de 19°C. La pluviométrie annuelle est d'environ 1800 mm/an. Le climat équatorial de montagne à deux saisons (sites de Melong et Santchou) : une saison sèche qui va de novembre à février, une saison des pluies qui commence en mars jusqu'en octobre. La température moyenne est de 25°C. La pluviométrie annuelle est d'environ 2500 mm/an.

Trois zones d'échantillonnages (Santchou, Melong, Bafang) ne comportent qu'une seule variété (robusta) avec un type de traitement par voie sèche. Les zones de Dschang et Bafoussam comportent la variété robusta avec un traitement par voie sèche mais aussi la variété arabica traitée soit par voie sèche soit par voie humide.

2.1.3. Café du Venezuela

Les prélèvements de café arabica ont été faits sur différents sites de Biscucuy dans le Municipio de Sucre et Chabasquen et le Municipio de Jose Vicente de Unda, état de Portuguesa, durant le mois de novembre 2010 (Figure 2.3 et Tableau 2.3).

82% du café du Venezuela est produit dans cinq états : Lara (24%), Trujillo (20%), Portuguesa (15%), Táchira (12%), et Mérida (11%).

Le climat du Municipio de Sucre et de Unda est de type tropical humide, avec 3 mois secs (de décembre à février) et 9 mois humide (mars à novembre), avec une moyenne annuelle de précipitations de 2600 mm/an. La température maximale est de 34°C et minimale de 16°C, avec comme valeur moyenne 24°C.

Tous les échantillons sont de la variété arabica. La récolte débute généralement au mois d'octobre pour trois mois. Nous avons prélevés des échantillons suivant deux types de qualité de café : « le grano de oro » (G.O) et le « convencional » (C).

La principale différence se situe au niveau du soin apporté lors des différentes étapes du traitement post récolte. Les grandes étapes de dépulpage, fermentation, lavage et séchage sont similaires. Pour le « grano de oro », la récolte est réalisée par la méthode du « picking ». Les récolteurs ne prélèvent que les cerises arrivées à pleine maturité. Cette méthode nécessite plusieurs passages car les fruits ne sont jamais mûrs en même temps. Ensuite le dépulpage est réalisé en fin de journée, suivi de la fermentation qui dure généralement toute la nuit (8 à 12h). Lorsque la

fermentation est terminée, le producteur lave le café. Ils réalisent en général 3 lavages successifs. Le café est mis ensuite à sécher soit de manière naturelle (séchage solaire) soit de manière artificielle (étuvage).

Pour le café type « concencional », la récolte est réalisée par la méthode du « strip picking », qui consiste à arracher la totalité des fruits mûrs et immatures. Les cerises immatures représentent environ 50% de la récolte. Le dépulpage est réalisé souvent un ou deux jours après la récolte. La fermentation dure toute la nuit, le café est moins bien lavé, le séchage est lui aussi de bien moins bonne qualité.

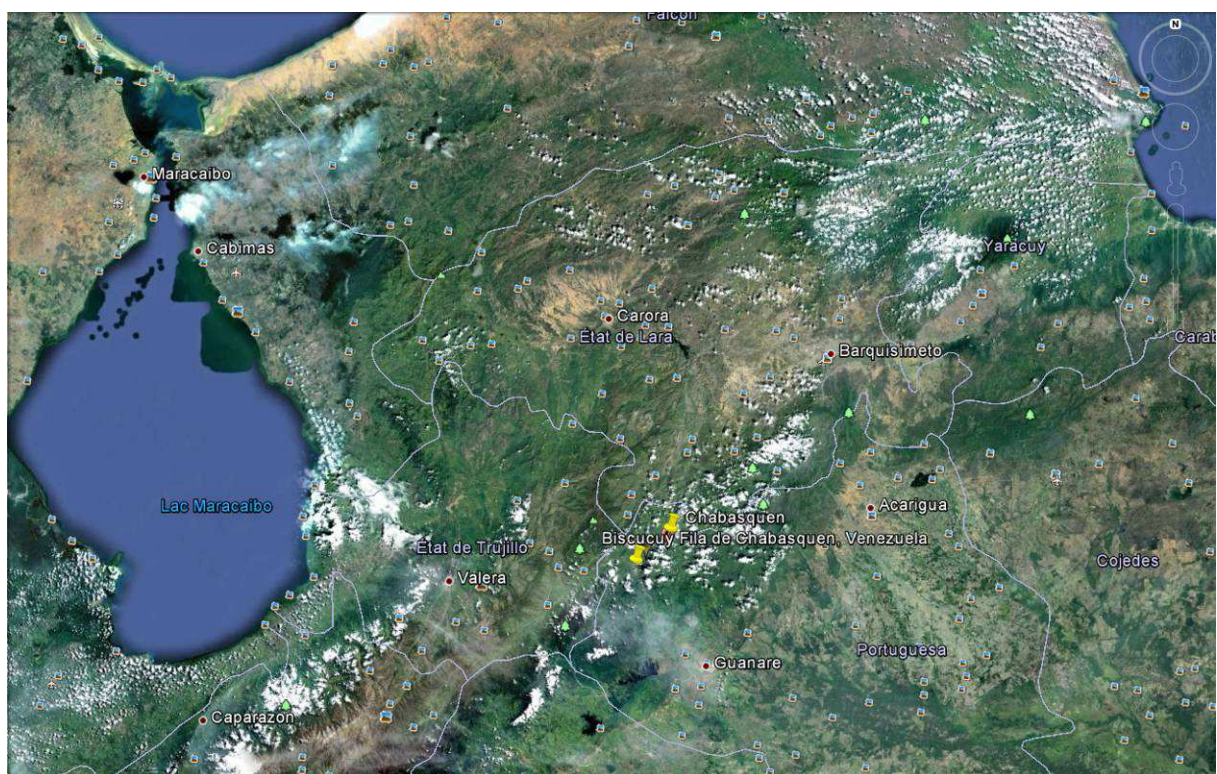


Figure 2.3 : Situation géographique des lieux de prélèvements du café au Venezuela : Biscucuy et Chabasquen. Municipio de Sucre, Etat Portuguesa.

Tableau 2.3 : Données géographiques et techniques des lieux de récolte des échantillons au Venezuela

Lieu	Finca (ferme)	Altitude	GPS		Post-récolte	Séchage
Chabasquen	Alcade/Cerro Seco	1314	9°25'16,8" N	-69°54'39,4" O	G.O / C	Solaire
Biscucuy	Buena Vista	1450	9°19'31,2" N	-70°04'17,9" O	G.O / C	Solaire
Biscucuy	San Rafael	1400			G.O / C	Solaire/ Artificiel
Biscucuy	Esperanza	1207	9°24'48,8" N	-70°01'02,0" O	G.O / C	Solaire/ Artificiel
Biscucuy	Las Flores	1450	9°20'41,2" N	-69°56'35,0" O	G.O / C	Solaire/ Artificiel
Biscucuy	La Vega	1345	9°19'30,9" N	-69°55'16,5" O	G.O / C	Solaire
Biscucuy	Santa Rita	699	9°21'14,8" N	-70°00'57,5" O	G.O	Solaire/ Artificiel
Chabasquen	Peña Blanca	1301	9°29'58,6" N	-69°55'29,3" O	C	Solaire
Chabasquen	Cruz Verde	1299	9°29'58,6" N	-69°55'29,3" O	C	Solaire
Chabasquen	La Palma	1200	9°30'12,7" N	-69°56'22,1" O	C	Artificiel
Biscucuy	Alto piedra	1020	9°11'42,4" N	-69°58'20,4" O	G.O / C	Solaire

2.2. Dosage de l'OTA et de ses dérivés

2.2.1. Extraction et purification de l'OTA à partir des grains de café

Les échantillons de café (parche, coque ou vert) sec ont été congelés à -80°C puis ont été broyés à l'aide d'un broyeur (Laboratory Mill 3600, Perten, Suède). 10 g de grains broyées ont été introduits dans un mixer-blender contenant 100 mL de solvant d'extraction (méthanol + solution de bicarbonate à 3%, 50/50), puis mixés pendant 2 min à vitesse maximale (22000 trs/min). L'extrait ainsi obtenu a été centrifugé à 3000 rpm pendant 30 min dans une centrifugeuse (2K15, Sigma, Germany) et environ 25 mL du surnageant ont été récupérés.

Le principe de fonctionnement de la colonne de purification repose sur la reconnaissance d'un antigène par des anticorps. La colonne d'immuno-affinité (Ochraprep®, R-Biopharm, France) contient une suspension en gel d'anticorps monoclonaux, spécifiques de l'Ochratoxine A.

Après extraction des molécules d'ochratoxines (OTA ET OTB), 10 mL du surnageant de centrifugation ont été dilués dans 30 mL de tampon phosphate à pH 7,3 (PBS) et

introduits dans une colonne d'immuno-affinité. Si l'extrait contient de l'ochratoxine A, elle va être fixée par les anticorps. La solution doit être à un pH de 7,3 afin de permettre la reconnaissance des ochratoxines par les anticorps. Les toxines sont éluées de la colonne avec du méthanol car ce solvant permet la destruction des liaisons antigènes-anticorps en modifiant la structure des anticorps. Le méthanol est ensuite évaporé sous courant d'azote à 70°C. Le résidu est repris dans 1 mL de phase mobile (eau/acétonitrile/acide acétique, 51/48/1) dans un flacon pour l'analyse par chromatographie liquide haute performance (HPLC).

2.2.2. Analyse des ochratoxines par HPLC : colonne et conditions opératoires

La quantification de l'OTA dans les extraits purifiés est faite par HPLC avec une détection fluorimétrique (Shimadzu LC-10 ADVP, Japan) (Nakajima *et al.*, 1997). Les conditions opératoires sont les suivantes : boucle d'injection de 100 µL, colonne HPLC en phase inverse C18, ODS granulométrie 5 µm de type uptisphere 5 ODB 250 X4.6 mm, avec pré-colonne identique, thermostatée à 35°C, débit isocratique de 1mL/min (phase mobile : eau/acétonitrile/acide acétique, 51:48:1), longueur d'onde d'excitation de 333 nm et d'émission de 460 nm. Les teneurs sont calculées à partir d'une courbe d'étalonnage établie à partir d'un standard OTA (1µg/mL ; réf PD 226 R. Biopharm Rhône Ltd, Glasgow, UK). Les autres produits de référence utilisés (OTB, OTα) ont été gracieusement fournis par le Dr Rémi Schneider de l'IFV (Institut Français de la Vigne et du Vin), coordinateur de l'UMT Qualinnov.

2.3. Biologie moléculaire

2.3.1. Protocoles d'extraction de l'ADN

2.3.1.1. Préparation des échantillons pour l'extraction de l'ADN des souches

- **Echantillons de café.**

Cette étape a pour objectif de récupérer les microorganismes présents à la surface des échantillons de café. 20 g de café sont ajoutés à 20 mL d'eau physiologique,

l'ensemble est agité à l'aide d'un agitateur rotatif à 12 rpm (ORBIT, Selecta, Espagne) pendant 1 heure. Les prélèvements sont effectués dans le surnageant.

▪ **Souches produites sur milieux de culture solides**

Deux types de préparation sont utilisés dans ce cas : des suspensions calibrées de spores sont préparées par grattage du mycélium d'une culture sur boîte de Pétri (chapitre 2.4.2.2) ou bien une partie ou la totalité du mycélium fongique est reprise dans une solution d'eau physiologique stérile. L'ensemble est agité à l'aide d'un agitateur rotatif pendant 1 heure. Les prélèvements sont effectués dans le surnageant.

2.3.1.2. Extraction des ADN

• **Extraction des ADN de bactéries**

L'extraction de l'ADN des bactéries est basée sur les méthodes de Ampe *et al.* (1999), Leesing (2005) et Le Nguyen *et al.* (2008).

Deux fois 2 mL de la solution de lavage du café sont prélevés et répartis dans deux tubes de 2 mL (duplicata). Le mélange est centrifugé à 12.000 rpm pendant 10 min et le surnageant est éliminé. Le culot cellulaire est dissous dans 100 µL de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 8,0, Promega, France). 100 µL de solution de lysozyme (25 mg.mL⁻¹, Eurobio, France) et 50 µL de solution de protéinase K (20 mg. mL⁻¹, Eurobio, France) sont ajoutés et le mélange est agité manuellement puis incubé à 42°C pendant 30 min. 50 µL de SDS 20% sont ensuite ajoutés à chaque tube et les tubes sont incubés à 42°C pendant 10 min après homogénéisation manuelle du mélange. 400 µL de MATAB (Sigma, France) sont alors ajoutés à chaque tube et les tubes sont incubés à 65°C pendant 10 min. 700 µL de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1, v/v/v Carlo Erba, France) est ajouté et les tubes sont agités manuellement puis centrifugés à 12 000 rpm pendant 15 min. La phase aqueuse est transférée dans un flacon Eppendorf. Cette étape de lavage avec le mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique est répétée une fois de plus. Le phénol résiduel est éliminé par extraction avec 600 µL de chloroforme/alcool isoamylique (24/1, Carlo Erba, France) et centrifugé pendant 15 min à 12 000 rpm. La phase aqueuse est recueillie et l'ADN est précipité par ajout de 0,1 volume d'acétate de sodium (3 M, pH 5), suivi de l'ajout d'un volume d'isopropanol glacé.

L'ADN dans l'isopropanol est incubé à -20°C pendant 12 h. Après centrifugation à 12 000 rpm pendant 15 min, le surnageant est éliminé, les culots d'ADN sont lavés avec 500 µL d'éthanol à 70% et les tubes sont centrifugés à 12 000 rpm pendant 15 min. L'éthanol est ensuite éliminé et les culots sont séchés à l'air à température ambiante pendant 45 - 60 min. L'ADN est remis en suspension dans 50 µL d'eau ultra pure et conservés à -20°C jusqu'à l'analyse.

- **Extraction des ADN de levures et de moisissures**

Pour l'extraction de l'ADN des levures et des moisissures, El Sheikha *et al.* (2009, 2010) ont créé un protocole modifié à partir des méthodes de Masoud *et al.* (2004) et Ros Chumillas *et al.* (2007), qui ont optimisé l'extraction d'ADN à partir de levures, et de Karakousis *et al.* (2006), qui ont travaillé sur l'extraction de l'ADN des moisissures.

Deux fois 2 mL de la solution de lavage du café (ou des suspensions de spores calibrées ou solutions des milieux de culture) sont prélevées et réparties dans deux tubes de 2 mL (en duplicata). Des billes de verre (0,3 g) de diamètre de 425 - 600 µm (Sigma, France) lavées à l'acide sont ajoutées à la suspension obtenue. Le mélange est agité vigoureusement pendant 30 min dans un agitateur Vortex (Genie 2 SI-A256, USA) puis centrifugé à 12.000 rpm pendant 15 min et le surnageant est éliminé. Le culot cellulaire est resuspendu dans 300 µL de tampon d'hydrolyse [2% Triton X-100 (Prolabo, France); 1% de SDS, 100 mM NaCl (Sigma, France), 10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA pH 8,0 (Promega, France)] et 100 µL de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (Promega, France), pH 8,0.

Après ajout de 100 µL de solution de lysozyme (25 mg.mL⁻¹, Eurobio, France) et 100 µL de solution de protéinase K (20 mg. mL⁻¹, Eurobio, France) sont ajoutés et le mélange est agité manuellement puis est incubé à 42°C pendant 30 min.

La suite du protocole est identique au protocole d'extraction d'ADN bactérien décrit ci-dessus.

2.3.1.3. Contrôle de l'extraction d'ADN

- **Sur gel d'agarose**

La quantité et la pureté des ADN extraits sont estimées par électrophorèse sur gel d'agarose (Promega, France) à 0,8% (p/v) dans un tampon TAE 1X (Eppendorf, Allemagne).

8 µL de la solution d'ADN extrait auxquels sont ajoutés 2 µL de la solution du colorant bleu/orange (Promega, France) sont déposés dans chaque puits du gel. Le marqueur a une taille moléculaire de 10000 kb (Invitrogen, USA). La migration dure de 45 min à 1h sous une tension de 100 V.

Le gel d'agarose est ensuite immergé dans une solution de bromure d'éthidium (Promega, France) à 0.1 µg/mL pendant 15 min, puis rincé durant 15 min à l'eau distillée avant d'être observé sur un trans-illuminateur UV à 318 nm. Le gel est photographié par une caméra digitale pilotée par le logiciel Gel Smart 7.3 (Clara Vision, Les Ulis, France).

▪ Avec un spectrophotomètre UV-Visible

La quantification et la pureté des ADN extrait sont estimées à l'aide d'un spectrophotomètre UV-Visible du type Biospec Nano (Shimadzu, Japon). Cet appareil mesure l'absorbance de l'échantillon dans une gamme de longueurs d'onde allant de l'UV au visible. La concentration en ADN est mesurée à 260 nm, tandis que les ratios des mesures effectuées à 260/280 et 260/230 permettent d'estimer le niveau de pureté de l'ADN. Ainsi le ratio 260/280 rend compte de la teneur en acides nucléiques / protéines et est idéalement compris entre 1,8 et 2 ; s'il est supérieur à 2 cela signifie que nous avons une contamination par l'ARN et s'il est inférieur à 1,8 cela signifie qu'il y a une teneur en protéines élevée. Le ratio 260/230 correspond au ratio acides nucléiques/inhibiteurs PCR et doit être compris entre 1,6 et 1,8.

2.3.2. Amplification des ADN extraits par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR)

2.3.2.1. Amplifications par PCR spécifiques des ADN d'*Aspergillus ochraceus*, *A. niger*, *A. westerdijkiae*, *A. carbonarius*

L'ADN génomique purifié est amplifié par PCR avec les amorces détaillées dans le Tableau 2.4, et déterminées soit par la technique de Sartori *et al.* (2006), pour *A.niger*, *A.carbonarius*, *A. ochraceus*, soit par la technique de Morello *et al.* (2007), pour *A.westerdijkiae*. Le milieu réactionnel est décrit dans le Tableau 2.5. Les conditions de PCR sont résumées dans le Tableau 2.6 (Sartori *et al.*, 2006 ; Morello *et al.*, 2007) : une dénaturation initiale à 95°C pendant 2 min, puis une série de 30 cycles incluant une dénaturation à 95°C pendant 1 min, une hybridation à 62°C

pendant 1 min, et une élongation à 72°C pendant 1 min et l'élongation finale à 72°C pendant 5 min. Les réactions de PCR s'effectuent dans un Thermo cycler (PTC-100 Peltier Thermal Cycler, MJ Research Inc., USA).

Tableau 2.4 : Amorces pour l'amplification spécifique de l'ADN génomique de *A.niger*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*.

Moisissures	Amorces	Séquences
<i>Aspergillus niger</i>	OPX7F ₃₇₂ (Sigma, France)	5` - <u>CAG TCG TCC AGT ACC CTA AC</u> – 3`
	OPX7R ₃₇₂ (Sigma, France)	5` - GAG CGA GGC TGA TCT AAG TG – 3`
<i>Aspergillus carbonarius</i>	OPX7F ₈₀₉ (Sigma, France)	5` - AGG CTA ATG TTG TAA CGG ATG AT – 3`
	OPX7R ₈₀₉ (Sigma, France)	5` - GCT GTC AGT ATT GGA CCT TAG AG- 3`
<i>Aspergillus westerdijkiae</i>	Bt2Aw-F	5` -TGA TAC CTT GGC GCT TGT GAC G – 3`
	Bt2Aw-R	5` - CGG AAG CCT AAA AAA TGA AGA G- 3`
<i>Aspergillus ochraceus</i>	OCA-V (Sigma, France)	5` - ATA CCA CCG GGT CTA ATG CA- 3`
	OCA-R (Sigma, France)	5` - TGC CGA CAG ACC GAG TGG ATT- 3`

Tableau 2.5 : Milieu réactionnel pour l'amplification spécifique de l'ADN génomique de *A.niger*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*.

Réactifs	Volume par puit (µL)	Concentration finale dans le mix (50µL)
Eau pure (Eppendorf, Allemagne)	16,25	/
DMSO	2.5	
Amorce GC NL1f (Sigma, France)	10	0,2 µM
Amorce LS2r (Sigma, France)	10	0,2 µM
MgCl ₂ 25 Mm (Promega, France)	3	1,5 Mm
dNTPs 10Mm par Dntp (Promega, France)	1	0,1 Mm
Tampon tag, 10X (Promega, France)	5	1
Taq polymérase 5U/µL (Promega, France)	0,25	1,25 U
Extrait d'ADN	2	/

Tableau 2.6 : Conditions des réactions de PCR pour l'amplification spécifique de l'ADN génomique de *A. niger*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*

Nombre de cycles	Température (°C)	Temps
1	95	2 min
30	95	1 min
	62	1 min
	72	1 min
1	72	5 min

2.3.2.2. Amplifications par PCR couplées à une analyse par DGGE

Amorces utilisées

Pour la méthode DGGE, un GC-clamp de 30 nucléotides est ajouté à l'amorce sens extrémité 5' afin d'assurer que le fragment d'ADN demeurera partiellement bicaténaire lors de la migration (Sheffield *et al.*, 1989).

○ Bactéries

La région V3 de l'ADNr 16S est amplifiée en utilisant le couple d'amorces GC-338f et 518r (Tableau 2.7). Ce couple d'amorce couvre la région polymorphe V3 allant des

positions 338 et 518 du gène de l'ARN 16S du ribosome de *E. coli* (Ampe *et al.*, 1999, Leasing, 2005 , Le Nguyen *et al.*,2008). La taille attendue des produits PCR est de 236 pb.

○ **Levures**

La région D1/D2 de l'ADNr 26/28S est amplifiée en utilisant deux couples d'amorces, un couple pour les levures GC-NL1f et LS2r (Tableau 2.7). Ce couple d'amorce couvre la région polymorphe D1/D2 allant des positions 27 à 50 pour NL1f et 266 à 285 pour LS2 du gène de l'ARN 26S du ribosome de *Saccharomyces cerevisiae* (M19229 numéro d'accèsion GenBank). Ils donnent un amplicon de 258 pb.

○ **Moisissures**

Pour les moisissures le couple d'amorces utilisé pour la PCR-DGGE est GC-U1f et U2r (Tableau 2.7). Le Primer U1 correspond aux coordonnées de 403 à 422, et l'amorce U2 correspond aux coordonnées de 645 à 662 d'un ADNr de référence du gène de l'ARN 28 S de *S. cerevisiae* (J01355 numéro d'accèsion GenBank). Ils donnent un amplicon de 260 pb.

Tableau 2.7 : Séquence des amorces ADN utilisées en PCR-DGGE pour analyser les ADN de bactéries, levures et moisissures

Micro organismes	Amorces	Position	Séquences
Bactéries	GC338f (Sigma, France)	338-357	5` - <u>CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC</u> <u>GGG GCG GGG</u> GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG – 3`
	518r (Sigma, France)	518-534	5` - ATT ACC GCG GCT GCT GG – 3`
Levures	GCNL1f (Sigma, France)	27 – 50	5` - <u>CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC</u> <u>GGG GCG GGG</u> GCC ATA TCA ATA AGC GGA GGA AAA G – 3`
	LS2r (Sigma, France)	266 – 285	5` - ATT CCC AAA CAA CTC GAC TC – 3`
Moisissures	GCU1f (Sigma, France)	403 – 422	5` - <u>CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC</u> <u>GGG GCG GGG</u> GTG AAA TTG TTG AAA GGG AA – 3`

	U2r (Sigma, France)	645 – 662	5` - GAC TCC TTG GTC CGT GTT – 3`
--	---------------------------	-----------	-----------------------------------

Mélanges réactionnels de PCR

L'amplification par PCR est réalisée dans une plaque de 96 puits SorensonTM (BioScience, USA).

Pour les ADN bactériens, le mélange réactionnel est préparé comme décrit par Le Nguyen *et al.* (2008) ; pour les ADN levuriens le mélange réactionnel est préparé comme décrit par El Sheikha *et al.* (2009) ; pour les ADN de moisissures le mélange réactionnel est préparé comme décrit par El Sheikha et Montet (2011) (Tableau 2.8).

Tableau 2.8 : Composition du mélange réactionnel pour l'amplification par PCR des ADN bactériens, des levuriens et des moisissures

	Réactifs	Volume par puits (μ L)	Concentration finale dans le mix (50 μ L)
Bactéries	Eau pure (Eppendorf, Allemagne)	14,5	/
	Amorce GC NL1f (Sigma, France)	10	0,2 μ M
	Amorce LS2r (Sigma, France)	10	0,2 μ M
	MgCl ₂ 25 Mm (Promega, France)	3	1,5 mM
	dNTPs 10Mm par Dntp (Promega, France)	2	0,2 mM
	Tampon taq, 10X (Promega, France)	5	1X
	Taq polymerase 5U/ μ L (Promega, France)	0,5	2,5 U
	Extrait d'ADN	5	/
Levures	Eau pure (Eppendorf, Allemagne)	18,75	/
	Amorce GC NL1f (Sigma, France)	10	0,2 μ M
	Amorce LS2r (Sigma, France)	10	0,2 μ M
	MgCl ₂ 25 Mm (Promega, France)	1	0,5 mM
	dNTPs 10Mm par Dntp (Promega, France)	3	0,2 mM
	Tampon taq, 10X (Promega, France)	5	1X
	Taq polymerase 5U/ μ L (Promega, France)	0,25	1,25 U
	Extrait d'ADN	2	/

Moisissures	Eau pure (Eppendorf, Allemagne)	16,25	/
	DMSO	2,5	/
	Amorce GC U1f (Sigma, France)	10	0,2 µM
	Amorce U2r (Sigma, France)	10	0,2 µM
	MgCl ₂ 25 Mm (Promega, France)	1	0,5 mM
	dNTPs 10Mm par Dntp (Promega, France)	3	0,2 mM
	Tampon taq, 10X (Promega, France)	5	1X
	Taq polymerase 5U/µL (Promega, France)	0,25	1,25 U
	Extrait d'ADN	2	/

Conditions de PCR et appareillage

Les réactions de PCR s'effectuent dans un Thermo cycler (PTC-100 Peltier Thermal Cyclor, MJ Research Inc., USA).

- Pour les ADN bactériens : l'amplification par PCR (Tableau 2.9) est réalisée selon la méthode Le Nguyen *et al.* (2008). Une dénaturation initiale à 94°C pendant 5 min, puis 10 cycles de « Touch down » avec une dénaturation à 94°C pendant 1 min, une hybridation à 65°C (cette température est abaissée de 1°C par cycle jusqu'à 55°C) pendant 1 min, et une élongation à 72°C pendant 2 min. Ensuite 20 cycles sont réalisés incluant une dénaturation à 94°C pendant 1 min, une hybridation à 55°C pendant 1 min, et une élongation à 72°C pendant 3 min. Ensuite, l'élongation finale est réalisée à 72°C pendant 10 min.

Tableau 2.9 : Conditions des réactions de PCR pour les ADN bactériens avant DGGE

Nombre de cycles	Température (°C)	Temps (min)
1	94	5
10	94	1
	65	1
	72	3
20	94	1
	55	1
	72	3
1	72	10

- Pour les ADN levuriens : l'amplification par PCR est réalisée selon les méthodes de Hesham *et al.* (2006) améliorée par El Sheikha *et al.* (2009) ; El Sheikha (2010) ; El Sheikha *et* Montet (2011) ; (Tableau 2.10). Une dénaturation initiale à 95°C pendant 5 min, puis 30 cycles incluant une dénaturation à 95°C pendant 1 min, une hybridation à 52°C pendant 2 min, et une élongation à 72°C pendant 2 min. Ensuite, l'élongation finale est réalisée à 72°C pendant 7 min.

Tableau 2.10 : Conditions des réactions de PCR pour les ADN levuriens avant DGGE

Nombre de cycles	Température (°C)	Temps (min)
1	95	5
30	95	1
	52	2
	72	2
1	72	7

- Pour les ADN de moisissures : l'amplification par PCR est réalisée selon les méthodes de El Sheikha *et* Montet (2011) ; El Sheikha *et al.* (2010) (Tableau 2.11). Une dénaturation initiale à 94°C pendant 3 min, puis une série d'opérations répétées 30 fois incluant une dénaturation à 94°C pendant 45 sec, une hybridation à 50°C pendant 50 sec, et une élongation à 72°C pendant 90 sec. Ensuite, l'élongation finale est réalisée à 72°C pendant 5 min.

Tableau 2.11 : Conditions des réactions de PCR pour les ADN de moisissures avant DGGE

Nombre de cycles	Température (°C)	Temps
1	94	3 min
30	94	45 sec
	50	50 sec
	72	90 sec
1	72	7 min

Contrôle des produits PCR

Avant de réaliser la migration sur le gel DGGE, les amplicons doivent être vérifiés par électrophorèse en gel d'agarose (Promega, France) à 2% (p/v) dans un tampon TAE 1X.

5 µL de la solution d'ADN extrait auxquels sont ajoutés 2 µL de la solution du colorant bleu/orange (Promega, France) sont déposés dans chaque puit du gel. Le marqueur de taille moléculaire est un marqueur d'échelle de 100 pb (Invitrogen, USA). La migration dure de 45 min à 1 h sous une tension de 100 V. Le gel est traité comme précédemment.

2.3.3. Électrophorèse en gel d'acrylamide avec gradient dénaturant (DGGE)

2.3.3.1. Composition du gel de DGGE

Les fragments d'ADNr amplifiés par PCR sont analysés par DGGE dans un gel à 8% d'acrylamide/bisacrylamide (37,5/1, v/v, Promega, France) contenant un gradient d'agents dénaturants qui s'étend de 30% à 60% pour les ADN bactériens (Le Nguyen *et al.*, 2008) et levuriens (El Sheikha *et al.*, 2010) et de 40% à 70% pour les ADN de moisissures (El Sheikha et Montet, 2011). Ce gradient est constitué d'urée (Promega, France) et de formamide (Promega, France) (Tableau 2.12) sachant que 100% correspond 7M d'urée et 40%(v/v) de Formamide. L'appareillage DGGE utilisé est le modèle Biorad Dcode (Biorad, USA).

Tableau 2.12 : Composition des solutions de préparation des gels de DGGE ayant un gradient de dénaturant de 30 à 60% (ADN levuriens et bactériens) et 40 à 70% (ADN de moisissures)

Constituants	Solution B1 : 30% de dénaturant	Solution A1 : 60% de dénaturant
40% Acrylamide/bisacrylamide	20 mL	20 mL
Formamide	12 mL	24 mL
Urée	12,6 g	25,2 g
TAE 50X	2 mL	2 mL
Eau qsp	100 mL	100 mL
Constituants	Solution B2 : 40% de dénaturant	Solution A2 : 70% de dénaturant
40% Acrylamide/bisacrylamide	20 g	20 g
Formamide	16 mL	28 mL
Urée	16,8 mL	29,4 mL
TAE 50X	2 mL	2 mL
Eau qsp	100 mL	100 mL

2.3.3.2. Préparation du gel DGGE

Les solutions A et B sont préparées dans deux tubes falcon (50mL) distincts avant d'être versées dans les compartiments A et B correspondants d'un préparateur de gradient (Bio-Rad Model 485, USA) (Figure 2.4). Aux 16 mL des solutions A1 et B1 ou A2 et B2 à 4°C sont ajoutés 50 µL de persulfate d'ammonium (APS) (Promega, France) à 10% p/v en eau distillée et 50 µL de Tétraméthyléthylènediamine (TEMED) (Promega, France).

Le gel est coulé dans un moule de 0,75 mm d'épaisseur entre deux plaques de verre de 200 mm de côté. Une pompe Percom-I, Watson-Marlon (USA) réglée à 20 tours/min permet de transférer le gel du préparateur de gradient jusqu'au moule. La durée de polymérisation du gel est au minimum d'une heure.

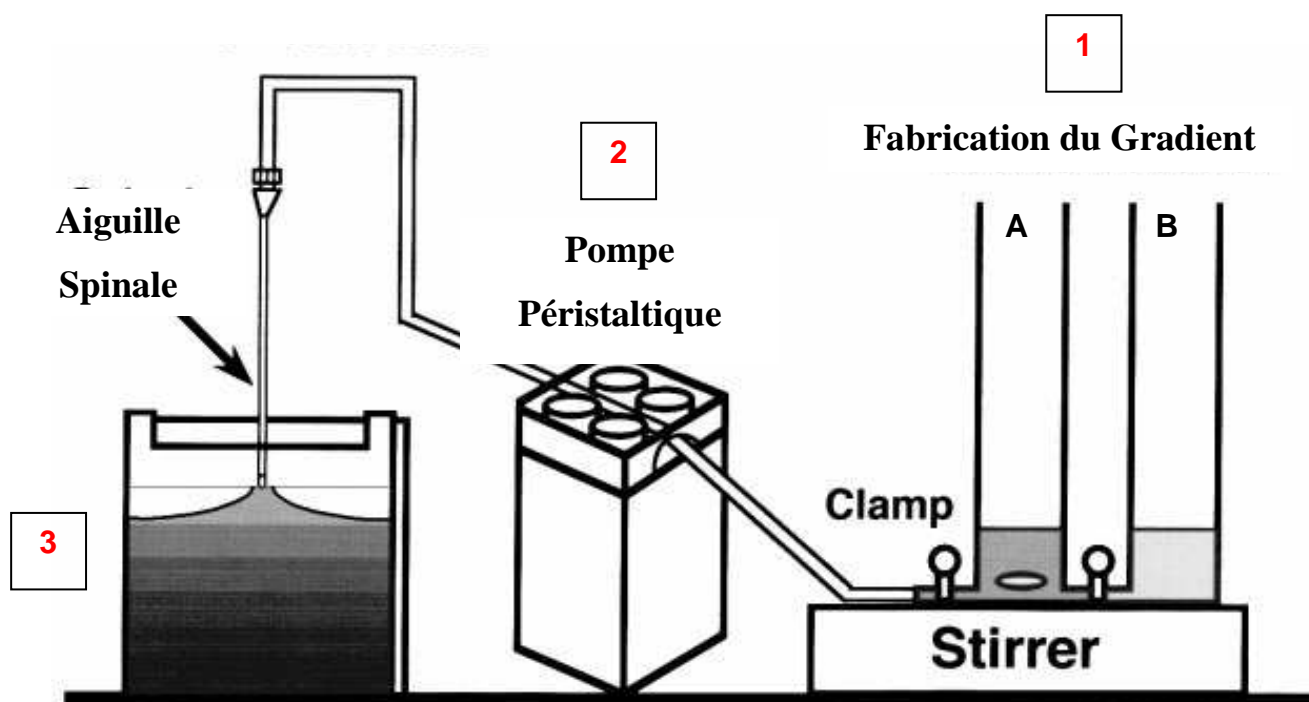


Figure 2.4 : Conditions de préparation du gel de DGGE :

(1) Fabrication du gradient, A : solution de haute concentration en dénaturant (60% pour les ADN levuriens et bactériens (A1) ou 70% pour les ADN de moisissures (A2)), B : solution à faible concentration en dénaturant (30% pour ADN levuriens et bactériens (B1) ou 40% pour les ADN de moisissures (B2)) + (2) Pompe péristaltique (3) sandwich des deux plaques de verre insérant le gel

2.3.3.3. Conditions de migration électrophorétiques de la DGGE

La cuve d'électrophorèse (Bio-Rad Dcode System, USA) est remplie de tampon TAE 1X (Tris-acétate, EDTA pH 8,3), et préchauffée à la température de migration de 60°C (Díez *et al.*, 2001a).

Le gel DGGE est placé dans la cuve préchauffée à 60°C et 10 µL de colorant bleu/orange (Promega, France) et 30 µL des produits issus de la PCR sont déposés par puit à la micropipette.

L'électrophorèse est exécutée en deux périodes successives, à 20 V pendant 10 min puis à 80 V pendant 12h pour les ADN bactériens (Le Nguyen *et al.*, 2008) et levuriens (El Sheikha *et al.*, 2009) et 16h pour les ADN de moisissures (El Sheikha et Montet, 2011). Après la migration, le gel est retiré délicatement des plaques de verre et immergé dans une solution de Bromure d'éthidium (Promega, France) à 0,1 µg/mL

pendant 30 min puis rincé avec de l'eau distillée (ou par du tampon TAE 1X) pendant 20 min. Le gel est ensuite observé sur le trans-illuminateur UV à 318 nm. Le gel est photographié par une caméra digitale et pilotée par le logiciel Gel Smart 7.3 (Clara Vision, Les Ulis, France).

2.3.3.4. Traitement d'image et traitement statistique des profils DGGE

L'image capturée par la caméra est enregistrée sous format TIFF (8-bits, niveaux de gris) en négatif (bandes d'ADN noires sur fond clair).

Les images sont ensuite traitées par le logiciel ImageQuantTL® version 2003 (Amersham Biosciences, USA).

Afin d'étalonner les gels, nous avons utilisé des produits d'amplification d'ADNr provenant de souches pures de bactéries (*E. coli* et *Lactobacillus plantarum*) de levures (*Wickerhamomyces anomalus* et *Komagataella pastoris*) et de moisissures (*Mucor racemosus* et *Trichoderma harzianum*). Ces ADN témoins permettent de vérifier le bon déroulement de la migration DGGE et leur position précise dans le gel après migration position de référence pour l'analyse des différentes bandes de nos échantillons. Ces ADN de référence permettent la comparaison des profils d'ADN bactériens, de levuriens et de moisissures d'un gel à l'autre.

La distance qui sépare les bandes représentatives des deux ADN témoins (*E. coli* et *L. plantarum* ou *W. anomalus* et *K. pastoris* ou *M. racemosus* et *T. harzianum*) est mesurée et appelée Dte. La position de chaque bande X est ensuite mesurée par rapport à la bande de référence de *W. anomalus* pour les ADN levuriens, *E. coli* pour les ADN bactériens et celle de *M. racemosus* pour les ADN de moisissures. Cette distance est appelée d (Figure 2.5).

La position relative (PR) de chaque bande est calculée selon la formule :

$$PR(X) = \frac{d}{DTe}$$

Ainsi, chaque bande d'ADN est caractérisée par sa position relative.

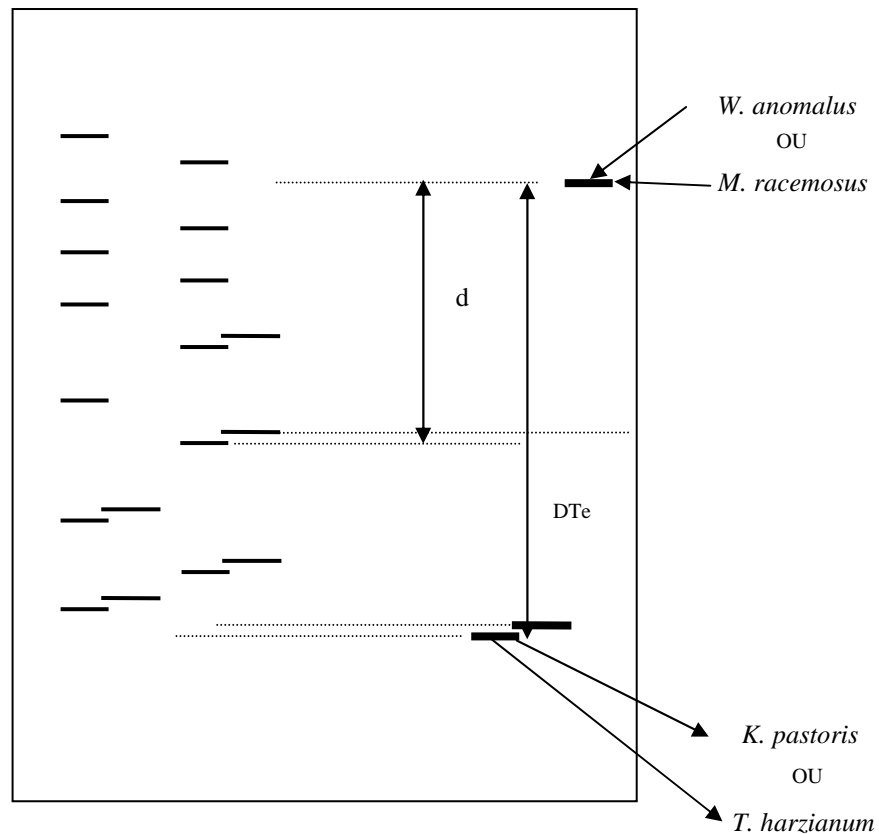


Figure 2.5 : Calcul de la position relative (PR) de chaque bande par exploitation d'un gel DGGE

Les profils DGGE diffèrent par le nombre, la position ou l'intensité des bandes qui les composent pour chaque piste (colonne) correspondant aux dépôts de produits de PCR obtenus à partir d'un extrait d'ADN. Il est possible pour chaque piste de coder la présence ou l'absence d'une bande à une position particulière par 1 (présence) ou 0 (absence). Ceci permet de calculer le nombre de bandes en commun entre chaque échantillon et de construire une matrice binaire à partir de laquelle un dendrogramme de distances est calculé (Schäfer et Muyzer, 2001 ; Fromin *et al.*, 2002).

Une fois la matrice des distances calculée, la méthode statistique UPGMA (Unweigthed Pair-Wise Grouping With Mathematical Averages) est utilisée pour tracer un dendrogramme qui illustre la classification des profils.

La méthode UPGMA est une méthode d'analyse des données binaires qui permet la construction de dendrogrammes et qui dépeint les distances en forme graphique, basées sur le degré de "dissimilarité" entre profils DGGE. Ceci permet une classification numérique des échantillons en utilisant le coefficient de similarité de

Dice (Kowalchuk *et al.*, 1997 ; Lebaron *et al.*, 1999 ; Gelsomino *et al.*, 1999 ; Griffiths *et al.*, 2000 ; Ibekwe *et al.*, 2001).

L'ensemble de ces analyses a été réalisé en utilisant le logiciel Statistica version 7.1 (StatSoft, France).

Le coefficient de similarité de Dice est utilisé (Heyndrickx *et al.*, 1996) selon la formule :

$$S_{\text{Dice}} = 100 \cdot 2 \cdot N_{AB} / (N_A + N_B)$$

Où :

N_{AB} représente le nombre de bandes communes aux échantillons (profils),

N_A et N_B : représentent le nombre de bandes dans les échantillons A et B, respectivement.

2.3.4. Séquençage des fragments d'ADN à partir des bandes DGGE

Les bandes visibles sont découpées sur le gel avec un scalpel stérile. L'ADN de chaque bande est ensuite élué dans 100 µL du tampon TE à 4°C pendant 12 h. Un échantillon de 100µL de l'ADN élué à partir de chaque bande est purifié avec un kit Wizard PCR Preps DNA Purification system (Promega, France) puis ré-amplifié par PCR dans les mêmes conditions décrites précédemment mais en utilisant dans ce cas des amorces sens sans GC-clamp. Les amplicons sont ensuite envoyés pour séquençage chez GATC Biotech (Allemagne). L'efficacité de cette procédure est vérifiée par l'électrophorèse des amplicons obtenus à partir des ADN découpés sur gel DGGE. Pour les bandes ayant la même position sur le gel DGGE et pour des pistes différentes, une seule bande représentative est purifiée puis réamplifiée avec l'amorce sans GC clamp. Cependant, quelques bandes de même position ont été séquencées afin de vérifier qu'elles correspondent bien à une seule et même séquence. Les séquences des ADNr 16S, 26S et 28S obtenues sont comparées à celles de la banque de données disponibles sur le site de GenBank de NCBI (National Center for Biotechnology Information databases) grâce au programme BLAST afin de déterminer les séquences connues les plus proches.

2.4. Microbiologie

2.4.1. Souches fongiques

Les souches *Aspergillus ochraceus* CBS 108.08 et *Aspergillus westerdijkiae* CBS 112803, utilisées comme souches de référence proviennent du Centraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn, Pays Bas).

Les autres souches de moisissures utilisées au cours de ce travail ont été isolées à partir de café, provenant de la Finca Jocutla (Veracruz, Mexique) suivant un traitement de type voie humide.

2.4.2. Tests de compétition/inhibition

2.4.2.1. Milieux de culture

3 types de milieux ont été utilisés :

- **le milieu PDA** (Potato Dextrose Agar) : ce milieu gélosé est un milieu de base pour l'isolement et la numération des moisissures et des levures. Afin d'inhiber ou ralentir la croissance des bactéries, son pH a été abaissé à 3,5 par addition de 10 mL/L d'acide tartrique à 10%. L'acide tartrique et le PDA ont été autoclavés séparément à 121°C pendant 15 min avant d'être mélangés aseptiquement en surfusion (55°C). Le milieu est conditionné en boîtes de Pétri.

- **le milieu « café »** : 45 g de café parche + 45 g de café coque dans 1,5 L d'eau sont portés à ébullition pendant 30 min. La décoction obtenue est ensuite filtrée aseptiquement sur membrane en acétate de cellulose (Sartorius) de porosité 0,45µm. Une solution d'agar, préalablement autoclavée à 121°C pendant 15 min, est additionnée volume à volume pour obtenir une concentration finale en agar de 15 g/L. 10 mL/L d'acide tartrique à 10% sont également ajoutés pour abaisser le pH du milieu à 3,5. Le milieu est conditionné en boîtes de Pétri.

- **le milieu « café + OTA »** : dans ce cas, de l'OTA a été rajouté stérilement au milieu « café » en fin de préparation avant conditionnement en boîtes de Pétri afin d'obtenir une teneur voisine avant ensemencement de 6 µg/ kg de milieu. Cette valeur est une moyenne des teneurs produites à J3 au cours de l'expérience réalisée dans le milieu précédent.

2.4.2.2. Protocole de culture

Conditions de préculture : les souches sauvages d'*A. niger*, *A. carbonarius*, *A. ochraceus* et *A. westerdijkiae* isolées du café ont été cultivées sur milieu PDA pH 3,5 à 28°C pendant 5 jours.

Standardisation des inocula : les conidies ont été récoltées par grattage dans une solution d'eau physiologique stérile. Après comptage des spores à l'hématimètre, des suspensions calibrées à 10^6 conidies/mL, 10^4 conidies/mL et 10^2 conidies/mL ont été obtenus par dilution des suspensions initiales.

Ensemencement : 5 µL des suspensions calibrées de chacune des souches en compétition ont été déposés soit au centre de la boîte de Pétri contenant le milieu testé soit de part et d'autre de la ligne médiane à 3 ou 5 cm de distance. 16 boîtes ont été ensemencées par modalité testée.

Incubation : les boîtes de Pétri ont été incubées à 28°C pendant 7 à 11 jours

Prélèvements : 2 boîtes ont été prélevées à J0, J3, J5, J7 et éventuellement J11 pour chaque modalité testée.

2.4.2.3. Mesure de la compétition/inhibition

La compétition/inhibition entre les différentes souches de moisissures a été évaluée sur 3 paramètres à J3, J5, J7 et éventuellement J11 :

- **La croissance des souches en compétition :** le diamètre des colonies a été mesuré et le pourcentage d'inhibition calculé par référence à la croissance du témoin (souche ensemencée seule).

$$\% \text{ inhibition} = (1 - D_e/D_t) \times 100$$

avec D_e , diamètre de la colonie dans l'essai considéré et D_t , diamètre de la colonie témoin

- **La production d'OTA :** la teneur en OTA du milieu est mesurée selon la méthode proposée par (Bragulat *et al.*, 2001 Suarez *et al.*, 2004 a,b) modifiée. Trois disques de milieu de 5 mm de diamètre sont prélevés par poinçonnage dans les colonies développées sur boîtes de Pétri. L'OTA est extraite avec 2,5 mL de solvant (méthanol/acide formique 25 :1) pendant 15 min dans un bain à ultrasons ; les extraits sont filtrés (Millex 25; 0,45 µm PTFE, Agilent Technologies) puis dosés par

HPLC dans les conditions décrites précédemment. Les résultats sont exprimés en µg d'OTA/kg.

- **La quantité d'ADN de chaque souche en compétition** : lors des essais de compétition mettant en jeu *A. ochraceus* et *A. westerdijkiae* en co-inoculation centrale les similarités morphologiques des 2 souches ne permettent pas de les différencier macroscopiquement. Leur croissance est donc mesurée par quantification de leurs ADN respectifs après extraction, et PCR-DGGE. La quantification est réalisée par analyse d'image avec le logiciel ImageQuantTL® version 2003 (Amersham Biosciences, USA).

2.4.2.4. Modalités

Différents essais ont été réalisés dans les conditions suivantes :

- **Sélection des compétiteurs** : ensemencement des souches 2 à 2 ; en co-inoculation en un point au centre des boîtes de Pétri ; à raison de 5 µL de suspension à 10^6 conidies/mL de chacune des 2 souches ; sur milieu PDA.

- **Etude de l'influence du taux d'inoculation du compétiteur** : ensemencement des souches 2 à 2 ; en co-inoculation en un point au centre des boîtes de Pétri ; à raison de 5 µL de suspension à 10^6 conidies/mL pour la souche-cible et 5 µL de suspension à 10^6 conidies/mL, 10^4 conidies/mL ou 10^2 conidies/mL pour la souche compétitrice ; sur milieu PDA.

- **Etude du mode de compétition** :

- Ensemencement des souches 2 à 2 ; de part et d'autre de la ligne médiane des boîtes de Pétri ; à raison de 5 µL de suspension à 10^6 conidies/mL de chacune des 2 souches ; sur milieu PDA.

- Ensemencement des souches 2 à 2 ; au centre des boîtes de Pétri ; en co-inoculation en un point à raison de 5 µL de suspension à 10^6 conidies/mL de chacune des 2 souches ; sur milieu « café ».

- Ensemencement des souches 2 à 2 ; au centre des boîtes de Pétri ; en co-inoculation en un point à raison de 5 µL de suspension à 10^6 conidies/mL de chacune des 2 souches ; sur milieu « café + OTA ».

3. Résultats et Discussion

3.1. Incidence de la dynamique des populations microbiennes sur la teneur en OTA du café vert

L'objectif de cette étude est double. D'une part, il s'agit de mieux connaître l'écologie microbienne du café et sa dynamique au cours de différents traitements post récolte, ceci en utilisant une approche moléculaire. Ceci nous permet d'autre part, d'accéder à la recherche de liens/corrélation éventuels entre la flore fongique et le taux d'ochratoxine A dans le café vert de diverses origines et variétés. Dans un premier temps, la méthodologie PCR-DGGE a été adaptée au cas du café, puis la méthode validée en termes de répétabilité, ainsi que de sensibilité. Dans un second temps, la méthode mise au point a été appliquée sur des échantillons de café arabica provenant du Mexique afin d'en étudier la flore bactérienne, levurienne et fongique en relation avec les traitements et provenances. Celle-ci a ensuite été utilisée pour étudier la corrélation éventuelle entre la flore fongique et la présence d'OTA sur des échantillons de café vert venant du Cameroun et du Venezuela.

3.1.1. Méthodologie existante sur d'autres matrices, adaptation à la matrice café

La PCR-DGGE a déjà été utilisée sur le café pour le suivi de l'évolution de l'écologie microbienne des bactéries et des levures (Vilela *et al.*, 2010 ; Masoud *et al.*, 2004). Cette méthode a également été appliquée à l'étude de l'écologie des bactéries, levures et moisissures sur des fruits (El sheikha *et al.*, 2009, 2010), c'est ce protocole qui a été adapté à la matrice café. Pour cela le ratio quantité de matrice (café) par rapport à la quantité de solvant d'extraction (eau peptonée ou eau physiologique) (Matériels et Méthodes cf 2.3.1) a été adapté pour minimiser l'effet des tanins et polyphénols présents naturellement en quantité importante dans le café, et qui sont des inhibiteurs de réactions enzymatiques nécessaires à notre étude (par exemple, les amplifications par PCR).

3.1.1.1. Répétabilité

La répétabilité de la méthode DGGE, a été testée sur 10 échantillons d'un même lot de café vert de Côte-d'Ivoire. Ces dix échantillons ont subi, le même type de

préparation (extraction, purification et amplification des ADN par PCR, puis migration par DGGE) suivant le protocole décrit au chapitre « Matériels et Méthodes » (cf 2.3.). Comme la Figure 3.1.1 le montre, les profils DGGE des 10 échantillons sont similaires.

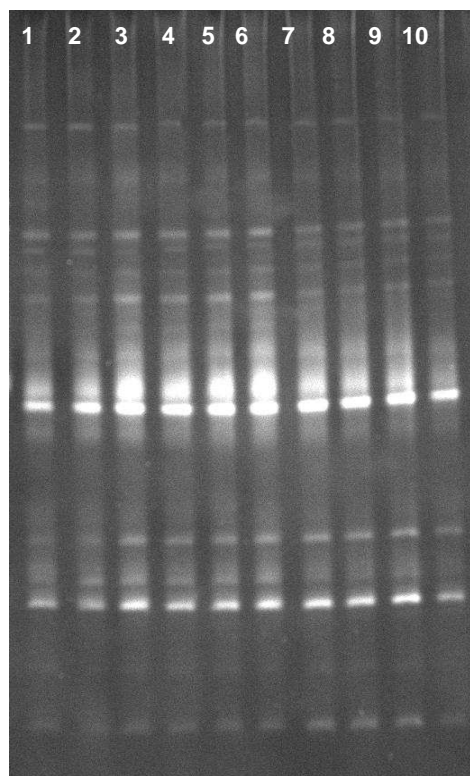


Figure 3.1.1. Profils DGGE obtenus à partir de 10 échantillons d'ADN provenant du même lot de café : Répétabilité de la méthode PCR-DGGE

Après traitement d'image grâce au logiciel Image Quant®, l'analyse de ces résultats a été réalisée en utilisant le coefficient de similarité de Dice (Heyndrickx *et al.*, 1996) calculé selon la formule :

$$SDice = 100 * 2 * NAB / (NA + NB)$$

Où : NAB représente le nombre de bandes communes aux échantillons (profils) et NA et NB représentent le nombre de bandes dans les échantillons A et B, respectivement.

Une analyse statistique de similarité à l'aide du logiciel PRIMER 6® (Figure 3.1.2) a été réalisée sur les 15 bandes principales mises en évidence après PCR-DGGE des 10 échantillons analysés, et la répétabilité obtenue a atteint au minimum 90%.

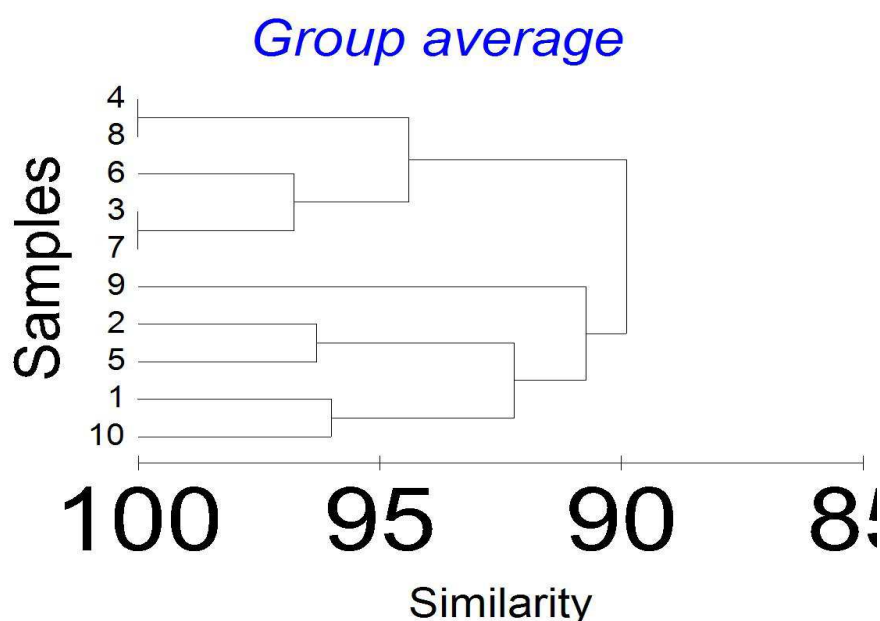


Figure 3.1.2 : Analyse de similarité de 10 échantillons provenant du même lot de café.

3.1.1.2. Sensibilité de la méthode

Alors que des données existent déjà en qui concerne la sensibilité pour les bactéries (de 10^2 à 10^5 UFC/mL en fonction de l'espèce considérées, Le Nguyen, 2008) et pour les levures (10^3 UFC/mL pour El Sheikha, 2010 ; 10^4 UFC/mL pour Van Elsas *et al.*, 2000), peu d'expériences sur la sensibilité de cette méthode sur les moisissures ont été réalisées. Au cours de cette étape nous avons donc défini le seuil de sensibilité de la méthode par rapport aux moisissures. Nous avons déterminé la quantité minimale d'ADN extrait à partir de spores fongiques détectable sur gel DGGE, extraction et amplification par PCR. La sensibilité a été testée sur des spores extraites de cultures pures de 3 espèces fongiques, à différentes concentrations (10^2 à 10^7 spores/mL): *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger*.

Les limites de détection dans des cultures pures sont présentées dans le Tableau 3.1.1.

Tableau 3.1.1: Limites de détection par DGGE de cultures pures pour des moisissures *Aspergillus ochraceus*, *A. carbonarius*, *A. niger* (spores/mL).

Moisissures/Concentration (spores/mL)	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2
<i>Aspergillus carbonarius</i>	+	+	+	+	-	-
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+	+	-	-
<i>Aspergillus ochraceus</i>	+	+	+	+	-	-

Les résultats sont considérés comme positifs quand il y a amplification par PCR, des ADN ainsi que la présence d'une bande sur le gel DGGE. La limite de détection est 10^4 spores/mL (Figure 3.1.3). Cette limite est relativement en accord avec d'autres études qui donnent des seuils de détection compris entre 10^3 spores/mL pour *Trichoderma harzianum* (Van Elsas *et al.*, 2000), 10^5 spores/mL de *Aureobasidium pullulans* et *Epicoccum nigrum* (Saad *et al.*, 2004). Dans notre cas pour les valeurs 10^3 et 10^2 spores/mL, c'est l'étape d'amplification par PCR qui est limitante.

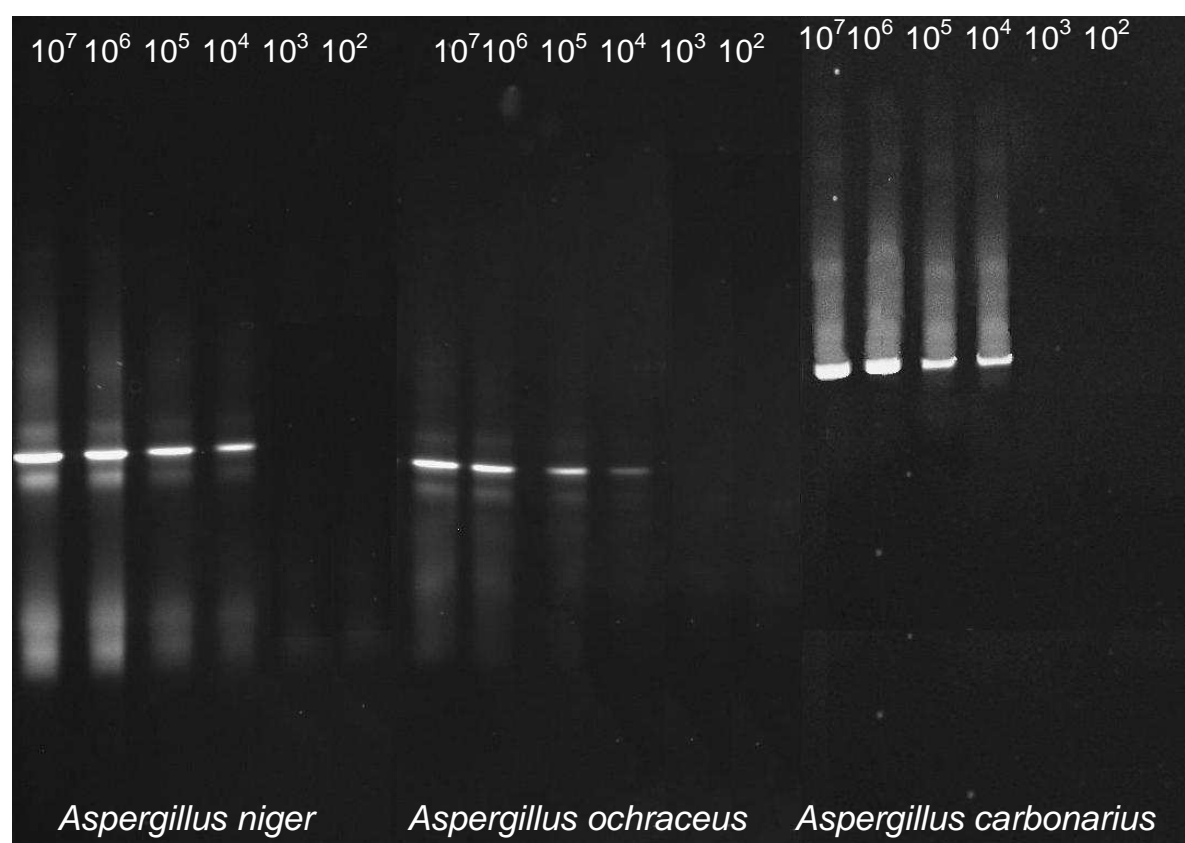


Figure 3.1.3 : Photo de gel de DGGE des différentes concentrations de *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* (10^2 – 10^7 spores/mL)

3.1.2. Etude de la flore microbienne totale : exemple du Mexique.

Dans cette partie seront traités les résultats obtenus à partir d'échantillons en provenance de trois fincas (fermes) dont la qualité de la récolte et le traitement post récolte conduisent à l'obtention de grains verts exempts d'OTA. Pour rappel, les traitements post récolte utilisés sont les suivants : voie humide mécanique pour la finca Andrade, voie humide et fermentation sous eau, pour la finca Jocutla et voie sèche pour la finca Zongolica.

3.1.2.1. Dynamique microbienne au cours des différents traitements

Pour chaque finca sont présentés 3 gels DGGE correspondant respectivement à l'analyse DGGE des ADNr des moisissures, levures et bactéries.

Sur chaque gel ont été déposés en duplicat des échantillons issus de chaque étape du process considéré, de la cerise au café vert.

3.1.2.1.1. Dynamique microbienne dans le café de la Finca Andrade

Dans ce cas le dépulpage du café est suivi d'une démucilagination mécanique puis séché et déparché.

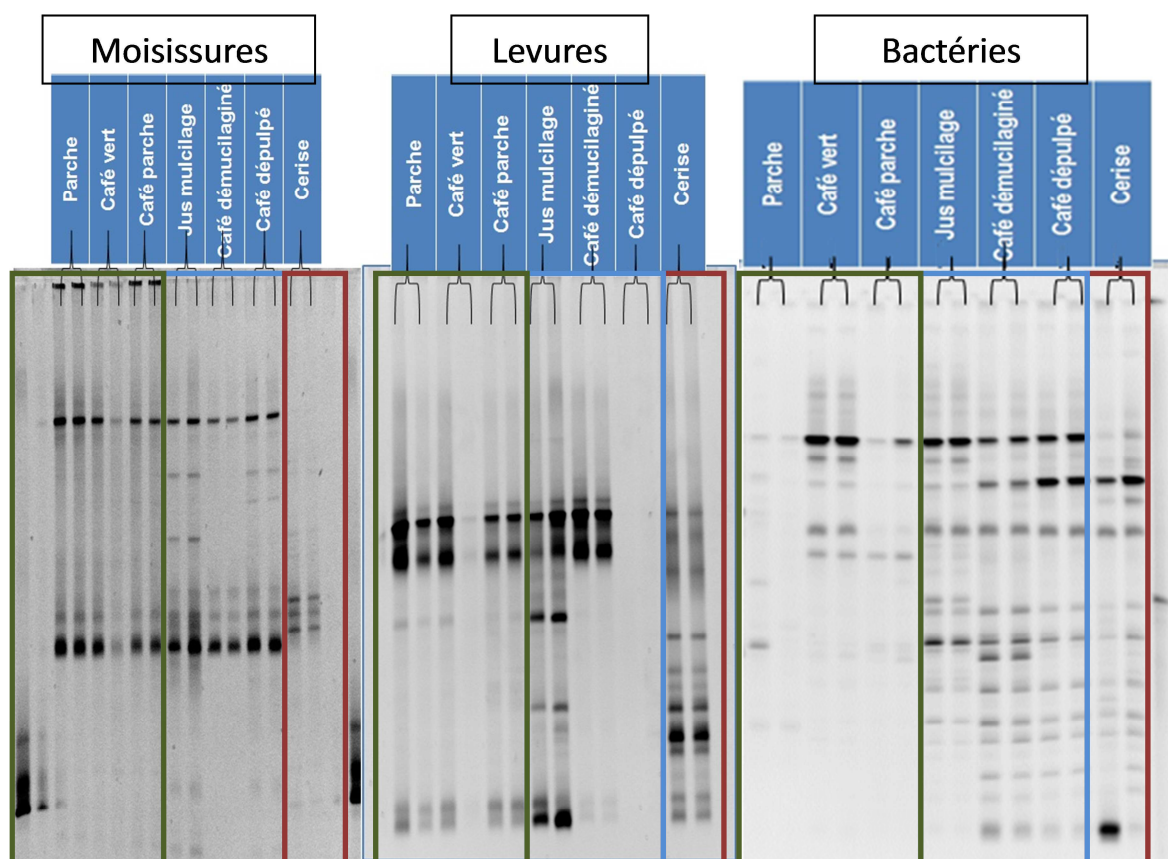


Figure 3.1.4 : Profils DGGE des échantillons de café correspondant aux différentes étapes du traitement du café de la finca Andrade

Nous pouvons observer sur la Figure 3.1.4 que la répétabilité entre duplicats est bonne, les empreintes étant les mêmes. D'autre part la flore microbienne semble évoluer au cours du process. Trois principaux profils sont observables :

- Celui de la population microbienne issue du champ sur la cerise (cadre rouge)
- Celui de la population microbienne issue du process depuis le dépulpage jusqu'au séchage (cadre bleu)
- Celui de la population microbienne issue du séchage sur le café vert et parche (cadre vert).

La diversité microbienne évolue différemment au cours du traitement en fonction de la nature de la flore microbienne (Tableau 3.1.2). En ce qui concerne les bactéries, le nombre d'espèces issues du champ est abondante, stable au cours du process, puis diminue ensuite de moitié lors du séchage. Pour les levures, le nombre d'espèces issues du champ est également important puis diminue au cours du process pour se stabiliser ensuite lors du séchage. Peu de moisissures différentes sont présentes sur

la cerise et le nombre d'espèces augmente faiblement au cours du process pour diminuer au séchage.

Toutefois le nombre d'espèces microbiennes reste globalement limité de part la nature et la qualité du traitement. Le dépulpage puis le démucilaginage mécanique éliminent en effet un substrat riche propice au développement microbien.

Tableau 3.1.2 : Nombre de bandes représentatives des bactéries (B), levures (L) et moisissures (M) obtenues de l'analyse des gels DGGE en fonction de l'étape du traitement dans la finca Andrade

Andrade	Cerise	Process	Séchage
B	16	16	8
L	12	6	6
M	3	6	3

La Figure 3.1.5 réalisée à partir l'analyse statistique de similarité (coefficient de similarité de Dice) réalisée à l'aide du logiciel PRIMER 6® et du logiciel Statistica permet de visualiser l'évolution qualitative des différentes flores microbienne au cours des étapes du traitement.

L'ACP (Statistica) nous donne une représentation de la diversité/similarité de la flore microbienne associée aux différents échantillons car elle rend compte de la fraction des espèces communes entre les échantillons. Les dendrogrammes de similarité (PRIMER 6®) complètent l'information en chiffrant la similarité observée sur la représentation précédente.

La flore fongique associée à la cerise se différencie clairement de la flore présente dans les étapes dans la suite du traitement (25% de similarité seulement). Par contre celles qui sont retrouvées sur le café dépulpe et démucilaginé sont très proches (plus de 85% de similarité) et également très voisines de celles du café vert et parche (environ 75% de similarité). La flore fongique associée au café vert, au café parche et au parche sont indissociable (100% de similarité). L'ACP permet de visualiser l'évolution de la flore depuis le café dépulpe jusqu'au café vert.

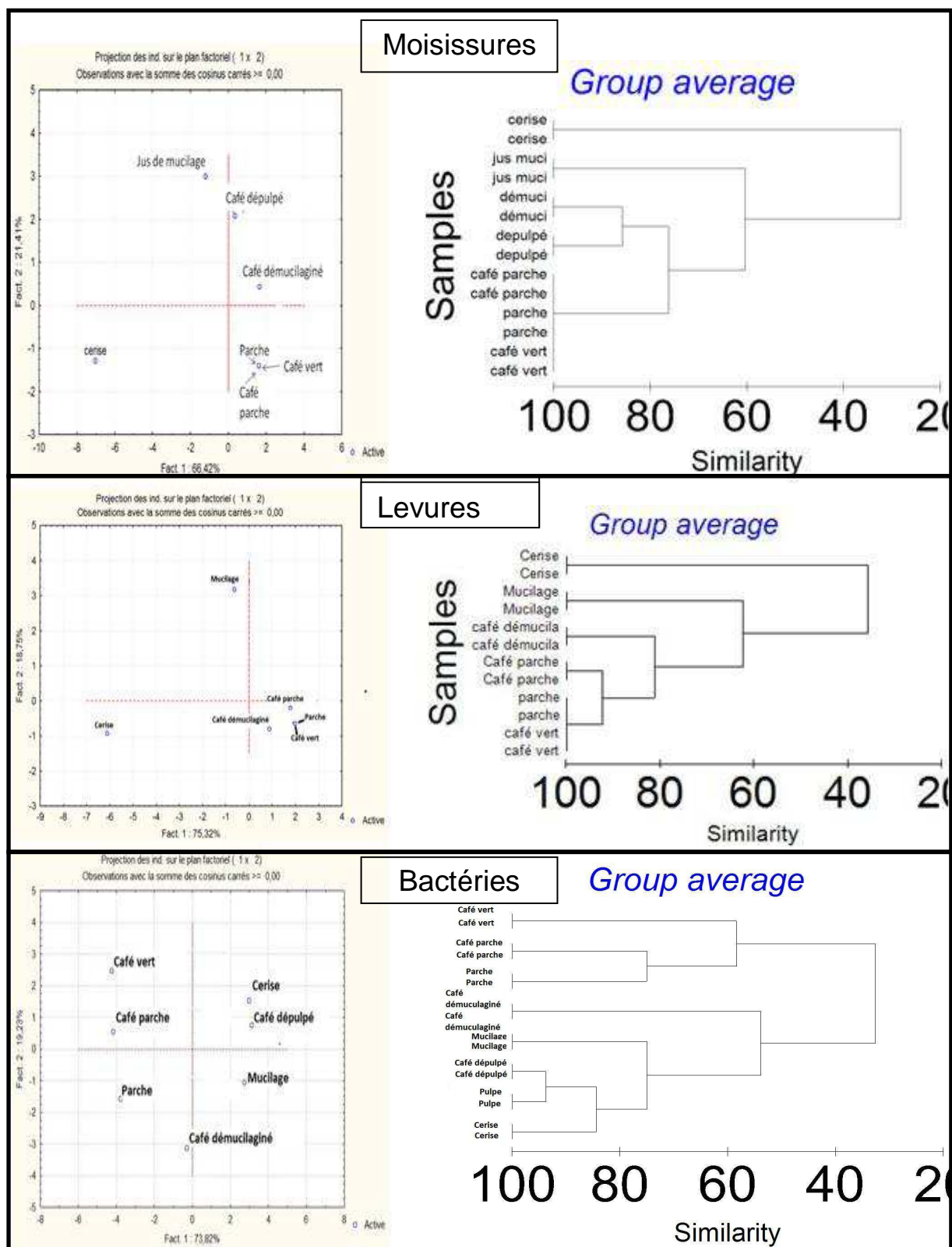


Figure 3.1.5 : Evolution qualitative des différentes flores microbienne dans les échantillons correspondant aux différentes étapes du traitement du café de la finca Andrade

En ce qui concerne les levures, la différenciation des flores est très semblable à celle des moisissures. D'une part, la variété des espèces retrouvées sur les cerises se différencie nettement des flores associées aux étapes du traitement (35% de similarité). Ceci alors que les flores associées au café vert et parche (plus de 90% de similarité) sont très proches de celles du café démucilaginé (80% de similarité). La flore levurienne associée au mucilage se situe dans une position « intermédiaire » en termes de similarité (60% par rapport au café vert et parche), de manière comparable à ce qui est observé pour la flore fongique issue du jus de mucilage.

L'écologie bactérienne du café montre une dynamique différente au cours du process, en comparaison des flores levuriennes et fongiques. Les flores bactériennes qui composent le café vert et parche ne sont similaires qu'à environ 30% aux autres flores présentes au cours du traitement. Et une différence de 40% existe entre flores issues du café vert et espèces issues du café parche (et de la parche) alors que celles-ci sont identiques dans le cas des flores fongiques. Le déparchage semble faire intervenir d'autres espèces bactériennes, et ceci peut-être en lien avec le matériel utilisé pour cette étape. Les flores bactériennes de la cerise et du café dépulvé sont similaires à 85%. Comme observé avec les flores fongiques et levuriennes, les espèces du café démucilaginé occupent une position intermédiaire, similaire à 55% avec la flore initiale.

Ces différents résultats concordent avec l'observation des gels DGGE qui montrent une évolution qualitative des trois types flores au cours du traitement. Les flores microbiennes retrouvées associées aux échantillons de café sont significativement différentes d'une étape à l'autre du traitement. Dans tous les cas, il est possible d'observer des espèces présentes de la cerise perdurer tout au long du traitement (process et séchage). A l'inverse, des espèces apparaissent ou disparaissent à chaque étape. Une différence de comportement est toutefois observable entre la flore bactérienne d'une part et la flore fongique d'autre part. Dans le premier cas la flore bactérienne initialement présente sur la cerise perdure jusqu'au café démucilaginé puis est modifiée qualitativement et quantitativement au cours du séchage. Dans le second cas, la flore fongique initiale est rapidement remplacée par une flore issue du traitement qui persiste au séchage, notamment dans le cas des espèces levuriennes en termes qualitatifs (présence) et quantitatifs (nombre d'espèces).

3.1.2.1.2. Dynamique microbienne dans le café de la Finca Jocutla

Dans ce cas le dépulpage du café est suivi d'une fermentation sous eau puis le café est séché et déparché.

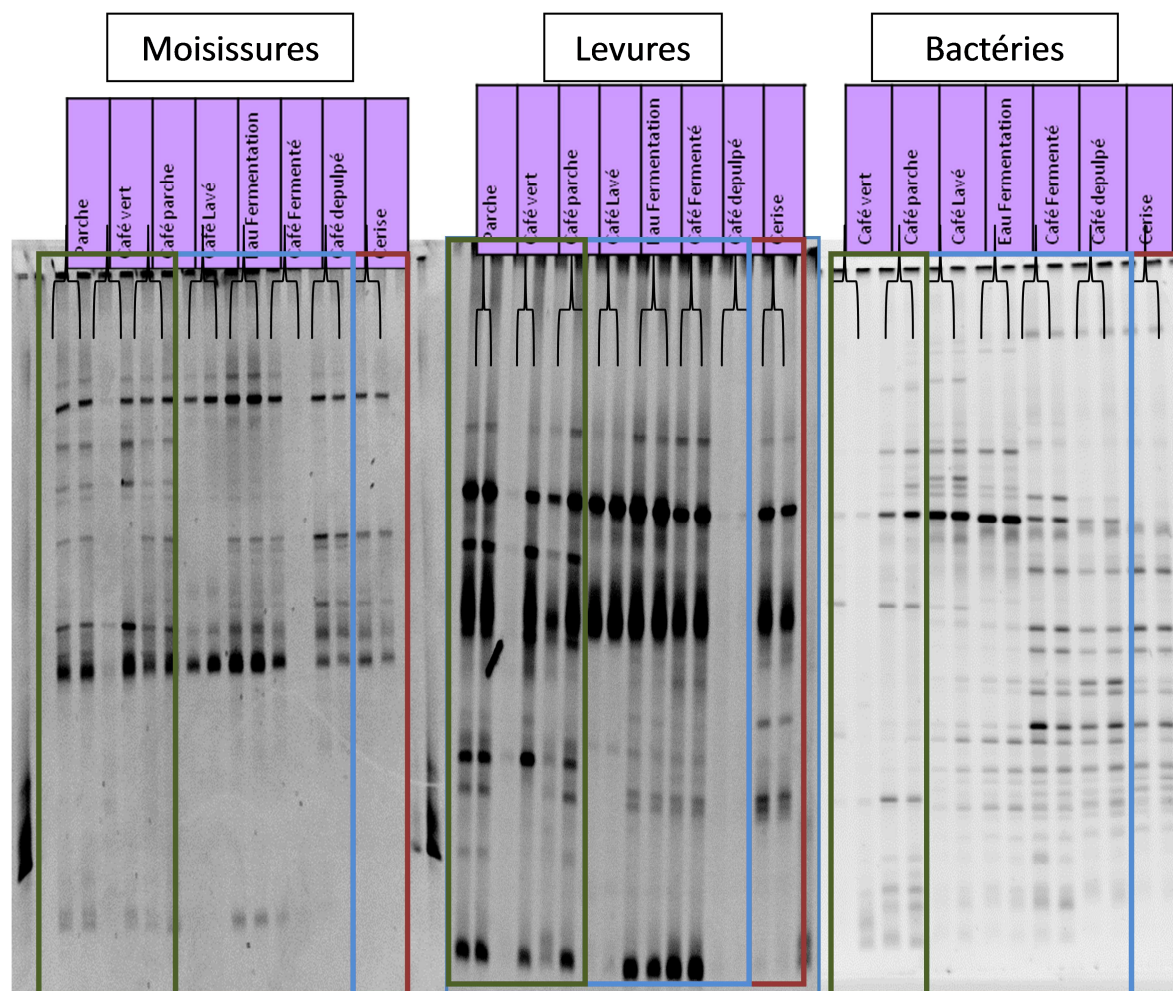


Figure 3.1.6 : Profils DGGE des échantillons correspondant aux différentes étapes du traitement du café de la finca Jocutla

Comme pour la finca Andrade avec le traitement voie humide mécanique, nous pouvons observer sur la Figure 3.1.6 que la répétabilité entre duplicats est bonne. La flore microbienne évolue également au cours du process et trois principaux profils sont observables en fonction du stade du traitement bien que les différences soient moins marquées que dans le cas de la finca précédente.

Toutefois il apparait que la diversité microbienne est bien plus importante quelque soit la flore étudiée lors de l'utilisation du procédé utilisant une fermentation sous eau

(Tableau 3.1.3). Le nombre d'espèces présentes est en moyenne multiplié par 2 pendant la phase du process. Ce phénomène est dû au type de process utilisé. Dans ce cas deux paramètres favorisent la prolifération microbienne. Il s'agit en effet d'une fermentation, qui, même courte, met en œuvre des microorganismes et, dans ce cas de fermentation sous eau, l'eau de fermentation est bien souvent réutilisée lors des process des lots suivants.

Tableau 3.1.3 : Nombre de bandes représentatives des bactéries (B), levures (L) et moisissures (M) obtenues de l'analyse des gels DGGE en fonction De l'étape du traitement dans la finca Jocutla

Jocutla	Cerise	Process	Séchage
B	17	23	16
L	9	14	13
M	5	12	9

Dans ce cas aussi il est possible d'observer certaines espèces présentes sur la cerise perdurer tout au long du traitement (process et séchage). A l'inverse, des espèces apparaissent ou disparaissent à chaque étape.

La diversité microbienne évolue différemment au cours du traitement en fonction de la nature de la flore microbienne. Le point commun aux trois types de flores est l'augmentation importante du nombre d'espèces au cours de la fermentation sous eau. Masoud *et al.*, (2004) ont également montré que la population levurienne augmentait durant la fermentation. En ce qui concerne les bactéries, les espèces issues du champ sont plus abondantes que les espèces fongiques mais la diversité bactérienne diminue plus fortement au séchage.

L'analyse statistique de similarité (Figure 3.1.7) conforte l'observation des gels DGGE puisque la flore bactérienne du café vert se différencie à 45% de celle du café issu de la fermentation et même à 75% de celle de la cerise, ces deux dernières présentant 65% de similarité. Comme précédemment une différence, de 25% dans ce cas, existe entre espèces issues du café vert et espèces issues du café parche alors que celles-ci sont identiques ou presque dans le cas des flores fongiques. La même hypothèse de l'intervention d'un autre type d'espèces bactériennes, en lien avec le matériel de déparchage, peut être émise. La flore initialement présente sur la

cerise perdure jusqu'au café lavé puis se modifie qualitativement et quantitativement au séchage.

Des résultats présentant la même tendance sont trouvés pour les espèces de moisissures. La flore du café vert se différencie à 35% de celle du café après fermentation et lavage et à près de 50% de celle de la cerise. Café vert et parche (près de 90% de similarité) sont regroupés dans un même cluster bien distinct de celui regroupant les espèces issues de la cerise jusqu'au café lavé (plus de 75% de similarité entre la flore de la cerise et celle du café lavé). Cette évolution des espèces est différente de celle observée dans le cas d'une démulagination par voie mécanique. Il semble que les moisissures présentes sur la cerise et au cours de la fermentation soient éliminées à la fin de celle-ci pour être remplacées par des espèces spécifiques du séchage ou spécifiques de l'aire de séchage.

L'évolution qualitative de la flore levurienne est dans ce cas très voisine de celle observée lors du traitement de la finca Andrade. Les espèces présentes sur la cerise se différencient à 45% de celles du café vert et parche qui sont, elles, similaires à 80% avec celles du café fermenté. La position de la flore retrouvée sur le café lavé est intermédiaire entre celle présente sur la cerise et celle issue du café vert, parche et fermenté, et est surprenante par rapport à la chronologie du traitement.

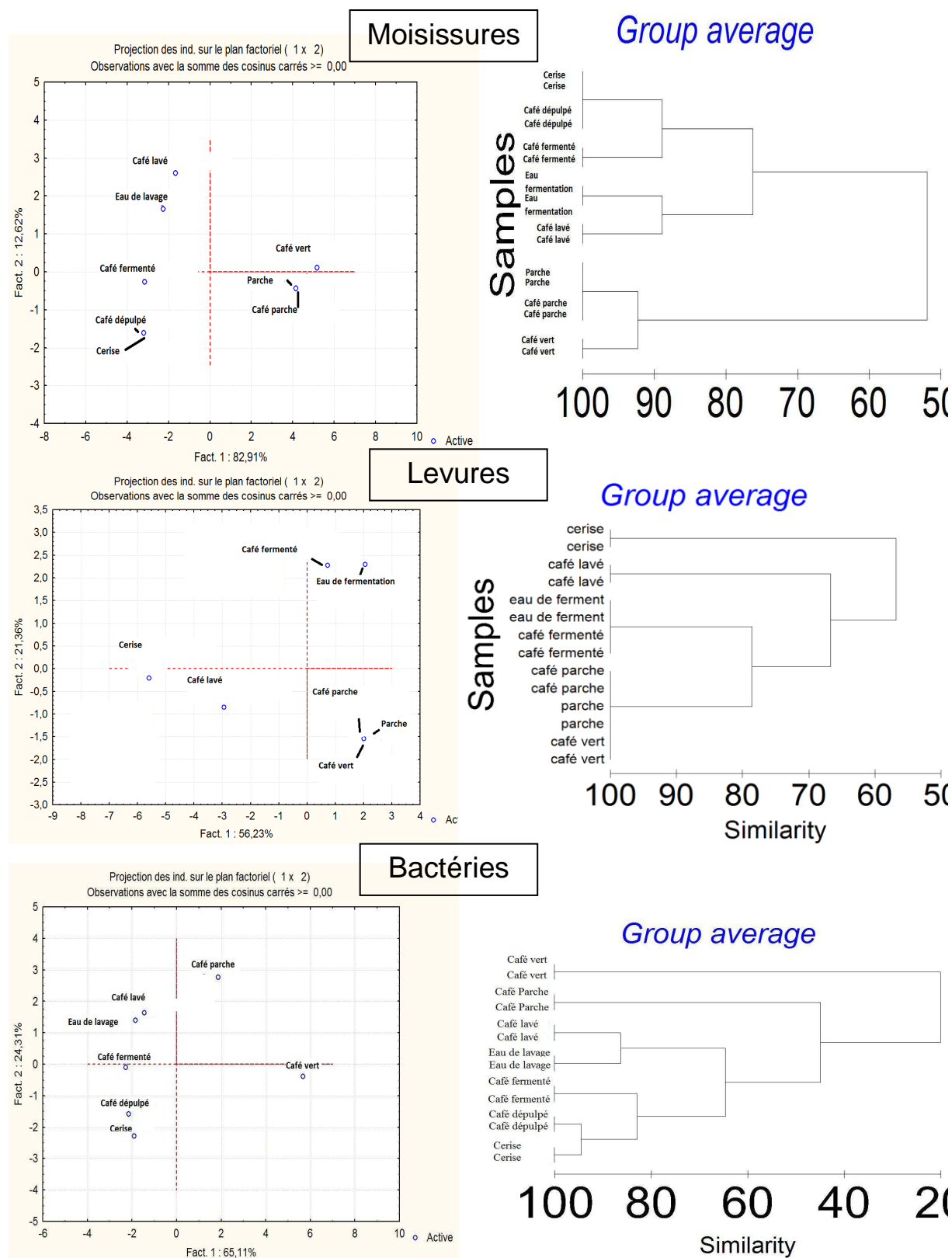


Figure 3.1.7 : Evolution qualitative des différentes flores microbienne dans les échantillons correspondant aux différentes étapes du traitement du café de la finca Jocutla

3.1.2.1.3. Dynamique microbienne dans le café de la Finca Zongolica

Dans ce cas le café est traité par voie sèche puis décortiqué.

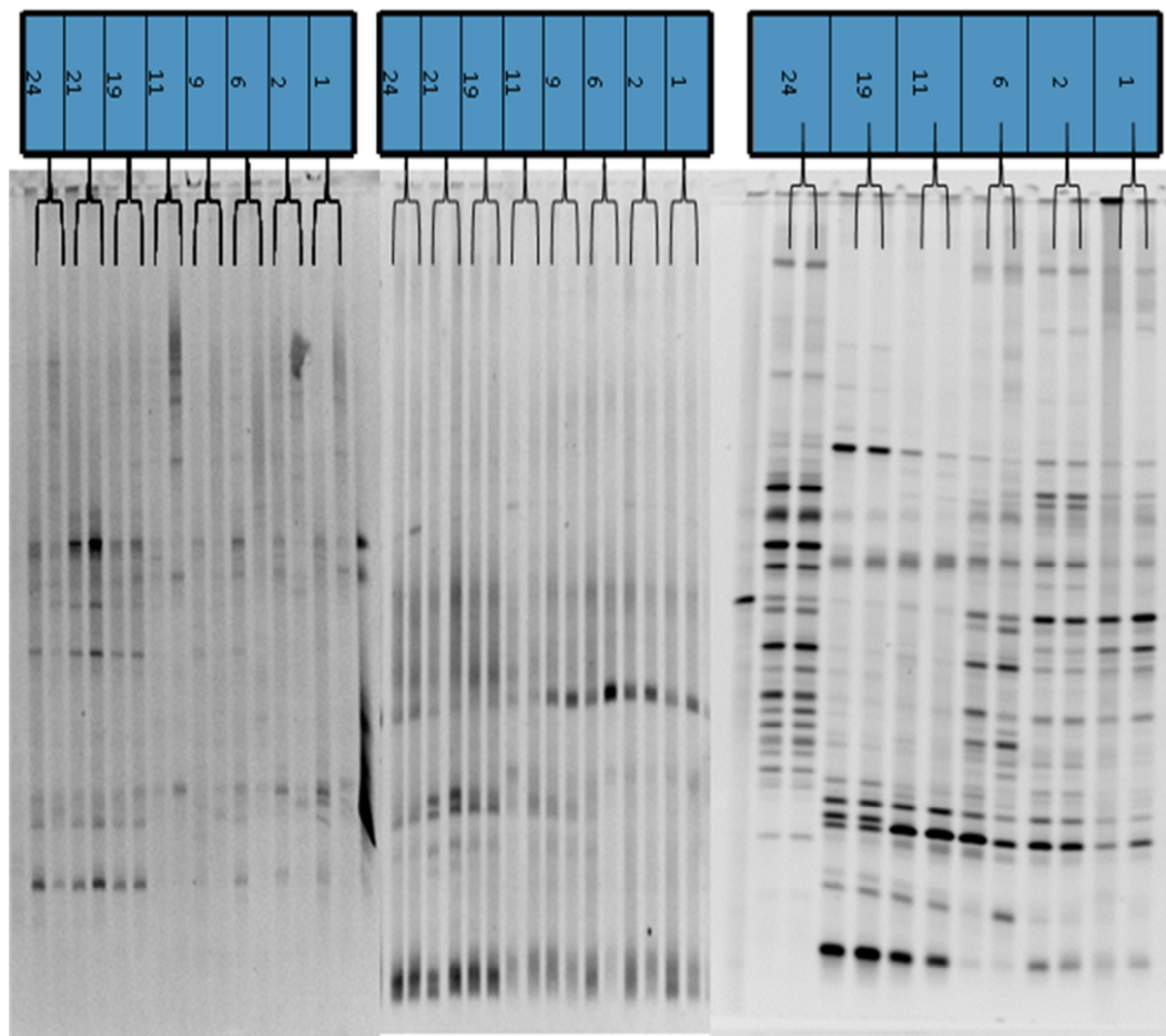


Figure 3.1.8 : Profils DGGE des échantillons correspondant aux différents jours de séchage durant le traitement par voie sèche du café de la finca Zongolica

Comme dans les deux cas précédents la répétabilité entre duplicats est bonne (Figure 3.1.8). La flore microbienne, notamment fongique, évolue cette fois peu durant le traitement au cours duquel peu d'évènements technologiques interviennent en dehors du brassage pour accompagner le processus de dessiccation et le décortiqué. L'influence des phénomènes climatiques (pluie et vent) est temporisée par le bâchage qui intervient dans ce cas.

Le nombre d'espèces fongiques (entre la cerise et le café vert) évolue peu au cours du traitement alors que celui des espèces bactériennes augmente après le décorticage (Tableau 3.1.4). Comme l'ont montré Silva *et al* (2000) qui ont isolé sur des cafés traités par voie sèche, plus de 764 souches microbiennes, la microflore la plus abondante durant le process voie sèche est la flore bactérienne suivie de la flore fongique puis, des levures.

Tableau 3.1.4 : Nombre de bandes représentatives des bactéries (B), levures (L) et moisissures (M) obtenues de l'analyse des gels DGGE en fonction De l'étape du traitement dans la finca Zongolica

Zongolica	Cerise	mi-séchage	Fin-Séchage
B	21	17	24
L	6	9	9
M	7	8	11

L'évolution qualitative des deux types de flores fongiques est très voisine. La similarité entre espèces retrouvées tout au long du séchage jusqu'au café vert est de 65% pour les levures et de 73% pour les moisissures (Figure 3.1.9). Les espèces présentes au départ persistent jusqu'au 6^{ième} jour de séchage. Elles sont regroupées dans un même cluster que celles présentes en fin de séchage et sur le café vert (similaires à 85%) dans le cas des moisissures alors que les espèces présentes aux 9^{ième} et 11^{ième} jours sont plus significativement différentes. Dans le cas des levures ce sont les espèces retrouvées à partir du 9^{ième} jour jusqu'au café vert qui sont associées en un cluster qui se différencie des espèces initiales. Dans les deux cas les espèces présentes à partir du 19^{ième} jour de séchage jusqu'à la fin du traitement sont identiques et il existe une différence entre les espèces présentes aux 9^{ième} et 11^{ième} jours (12% pour les moisissures et 5% pour les levures). Cette évolution de la flore fongique traduit les différentes étapes du séchage. En fonction du temps et donc de la diminution de la teneur en eau, des espèces fongiques plus adaptées aux conditions succèdent aux précédentes. Les modifications de la flore observée sur les jours 9 et 11 laissent penser que ceux-ci correspondent à une période de transition importante dans le séchage. Les mesures de teneur et surtout d'activité de l'eau sur ces dates auraient pu le confirmer.

Les changements qualitatifs de la flore bactérienne sont quant à eux plus continus que par phases. Les espèces sont différentes à au moins 15% entre chaque jour de mesure. D'une manière générale la diversité est plus marquée puisque la similarité entre espèces retrouvées tout au long du séchage jusqu'au 19^{ième} jour n'est que de 62% et que les espèces retrouvée sur le café vert diffèrent de 45% de toutes les autres, ce qui est d'ailleurs bien observable sur le gel DGGE. Il semble que la flore évolue progressivement en fonction de son caractère xérophile mais la différence observée sur le café vert parait plus liée à l'impact du décorticage (matériel utilisé) avec l'apparition d'espèces différentes de celles rencontrées lors du séchage.

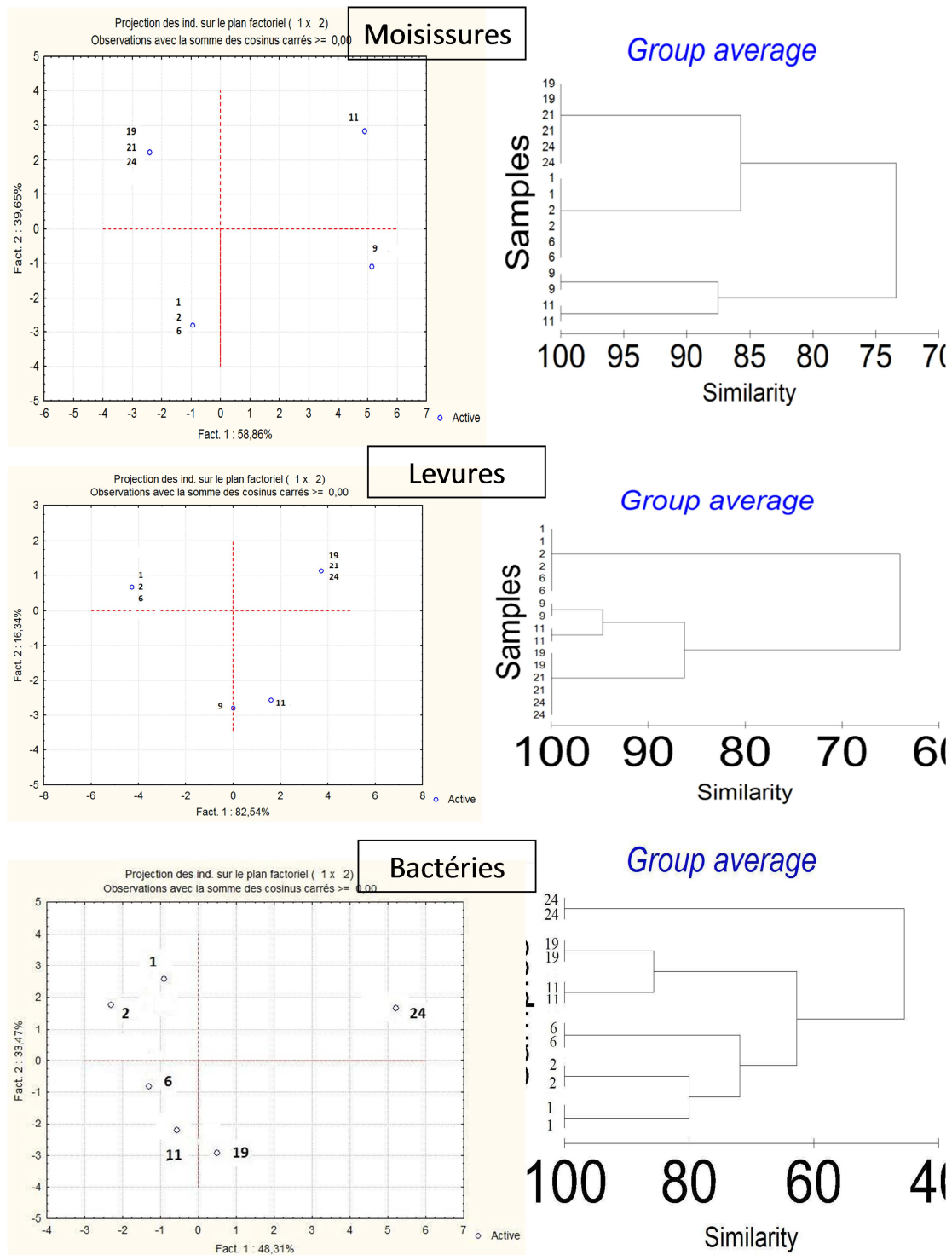


Figure 3.1.9 : Evolution qualitative des différentes flores microbienne dans les échantillons correspondant aux différents jours de séchage durant le traitement par voie sèche du café de la finca Zongolica

3.1.2.2. Identification des souches

La création d'une base de données qui permettra l'identification des espèces directement sur des gels DGGE par leur position est l'objectif principal de cette partie. Cette base de données sera alimentée à partir des distances de migration des amplicons d'ADNr issus de souches pures, mais aussi à partir d'identification d'espèces issues du café du Mexique, séparées par DGGE et identifiées ensuite par séquençage.

3.1.2.2.1. Comparaison des ADNr de souches pures par PCR-DGGE

A partir de souches pures de microorganismes de diverses origines (levures et moisissures), l'ADN génomique a été extrait, puis amplifié par PCR avec des amorces universelles spécifiques de chaque type de microorganismes et séparé par DGGE (Figures 3.1.10, 3.1.11) suivant les protocoles énoncés dans le chapitre « Matériels et Méthodes » (cf 2.3.3.).

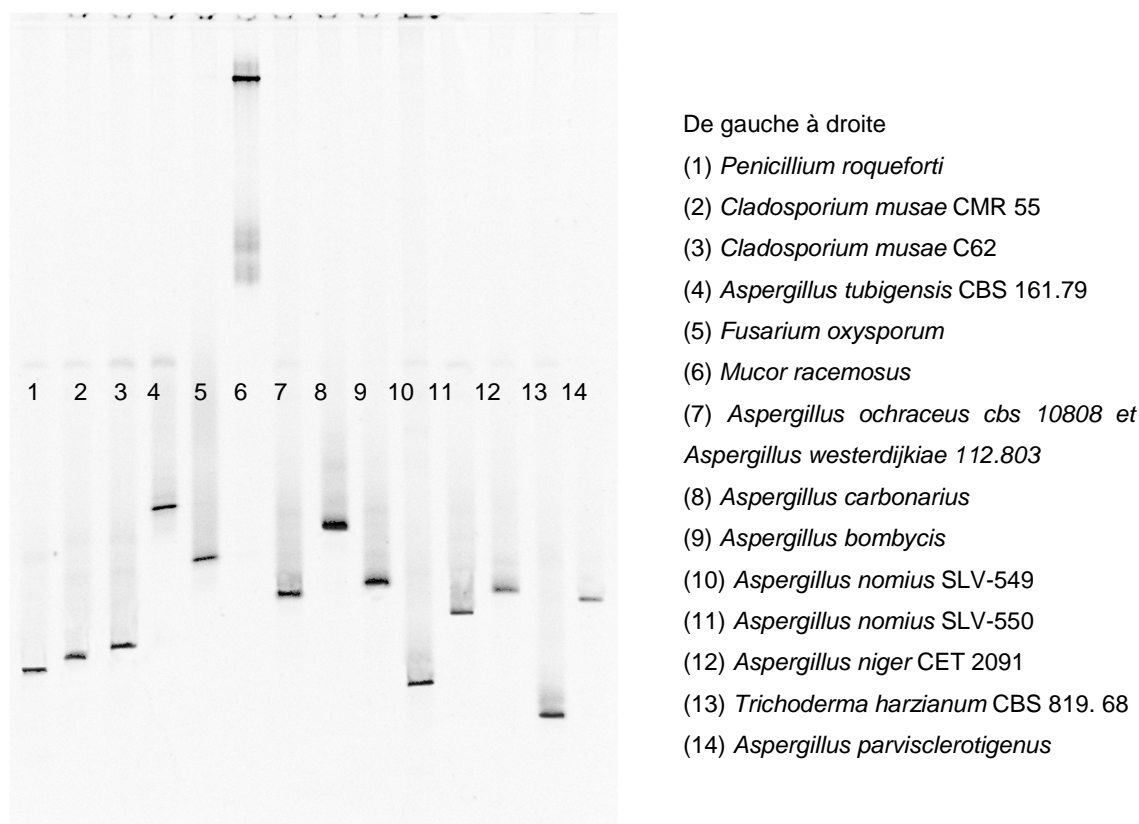
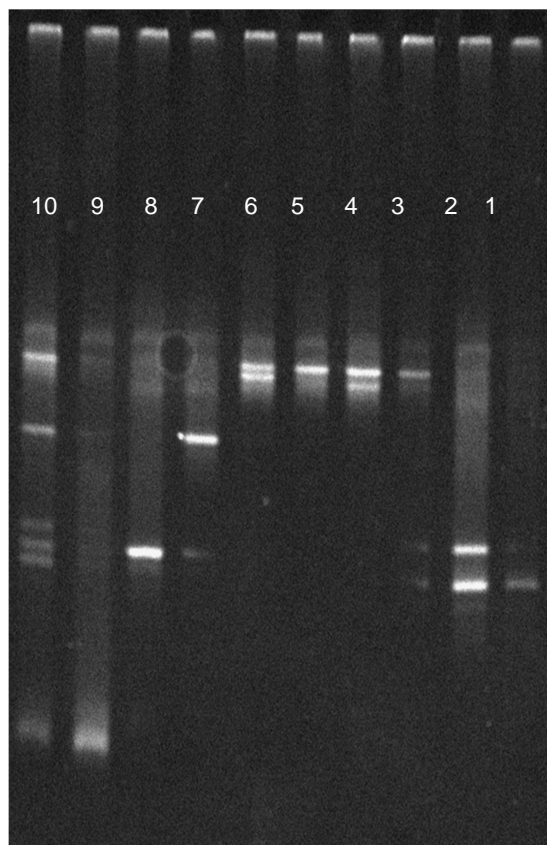


Figure 3.1.10 : Photo de gel de DGGE présentant les amplicons d'ADNr de différentes souches pures de moisissures



De droite à gauche

- (1) *Saccharomyces cerevisiae* EC 1118
- (2) *Saccharomyces uvarum* S6 U + *Saccharomyces cerevisiae* EC 1118
- (3) *Wickerhamomyces anomalus* + *Pichia sorbitophila*
- (4) *Candida parapsilosis* + *Debaromyces varriyi*
- (5) *Torulaspora delbrueckii*
- (6) *Candida parapsilosis*.
- (7) *Troulopsis glabrata*
- (8) *Wickerhamomyces anomalus*
- (9) *Candida valida*
- (10) Mix (2 + 3 + 4 + 7 + 9 + 10)

Figure 3.1.11 : Photo de gel de DGGE présentant les amplicons amplifiés de l'ADNr de différentes souches pures de levures

L'étude de la variation des distances de migration sur gel de DGGE de l'ADN de 15 espèces de moisissures a montré globalement une bonne séparation ces amplicons mais certains ne sont pas séparés ou ont des distances de migrations voisines comme *A.ochraceus* et *A.westerdijkiae* ; *A.carbonarius* et *Cladosporium musae*. Nous avons observé également des phénomènes de co-migration pour la séparation des levures (*Wickerhamomyces anomalus*, *Pichia sorbitophila*, *Candida parapsilosis*, *Debaromyces varriyi*, *Torulaspora delbrueckii*). En ce qui concerne les bactéries ces phénomènes avaient été décrits par Henri-Dubernet et *al.* (2004).

3.1.2.2.2. Séquençage de bandes isolées des gels DGGE

Après séparation des amplicons des ADN de diverses espèces fongiques ou bactériennes issues du café du Mexique, les bandes sont découpées sur le gel avec un scalpel stérile. L'ADN de chaque bande est purifié, puis ré-amplifié par PCR et ensuite envoyé pour séquençage chez GATC Biotech (Allemagne). Les séquences

des ADNr 16S, 26S et 28S obtenues sont comparées à celles de la banque de données disponibles sur le site de GenBank de NCBI (National Center for Biotechnology Information databases) grâce au programme BLAST afin de déterminer les séquences connues les plus proches.

Les phénomènes de co-migration observés lors des migrations sur gel DGGE avec des souches pures sont également mis en évidence par le séquençage de bandes isolées des gels DGGE.

De plus, même avec une séquence de qualité, sans co-migration, il reste difficile d'identifier avec certitude une espèce. En effet si l'on compare la séquence à identifier à celles de la banque de données disponibles sur le site de GenBank de NCBI grâce au programme BLAST, nous obtenons quelquefois plusieurs propositions d'espèces pour des pourcentages d'identités et de recouvrement identique (Figure 3.1.12). Ceci est dû au fait que la taille de notre amplicon (250 pb) est trop court pour décrire une variation génétique suffisante et nécessaire pour une identification précise.

Sequences producing significant alignments:							
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
JN939742.1	Geastrum cf. triplex B KH-2011 strain B037 28S ribosomal RNA (LSU) ge	316	316	90%	4e-83	93%	
AY821888.1	Paracoccidioides cerebriformis isolate 741 28S ribosomal RNA gene, part	316	316	90%	4e-83	93%	
U81264.1	Aspergillus penicillioides 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	316	316	90%	4e-83	93%	
HE578068.1	Aspergillus conicus genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S	300	300	90%	4e-78	92%	
AY216666.1	Aspergillus caesiellus strain CBS 470.65 28S ribosomal RNA gene, partial	285	285	87%	1e-73	91%	
AY821887.1	Paracoccidioides cerebriformis isolate 750 28S ribosomal RNA gene, part	279	279	90%	5e-72	90%	
AY821886.1	Paracoccidioides cerebriformis isolate 361 28S ribosomal RNA gene, part	279	279	90%	5e-72	90%	
AY753205.1	Aspergillus penicillioides 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	279	279	90%	5e-72	90%	
U81265.1	Aspergillus penicillioides 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	279	279	90%	5e-72	90%	
GU017541.1	Aspergillus penicillioides isolate KH00279 28S ribosomal RNA gene, partiz	274	274	90%	2e-70	90%	
GU017535.1	Aspergillus penicillioides isolate KH00251 28S ribosomal RNA gene, partiz	274	274	90%	2e-70	90%	
FR848828.2	Eurotium sp. CCF 4098 18S rRNA gene (partial), ITS1, 5.8S rRNA gene,	272	272	87%	8e-70	90%	
AY38918.1	Eurotium herbariorum strain DAOM 221134 28S ribosomal RNA (LSU) ger	272	272	87%	8e-70	90%	
JF922029.1	Eurotium herbariorum strain CBS516.65 5.8S ribosomal RNA gene, partia	272	272	87%	8e-70	90%	
HE578069.1	Eurotium niveoglaucum genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5	272	272	87%	8e-70	90%	

Figure 3.1.12 : Exemple de BLAST d'une séquence d'un fragment PCR de moisissure séparé par DGGE.

Notre objectif initial de créer une base de données basé sur les distances de migration des amplicons, s'avère difficile à réaliser du fait de deux problèmes majeurs. Tout d'abord, les phénomènes de co-migration, et ensuite la taille de nos amplicons qui limite l'identification des espèces par comparaison dans les bases de données. Nous pouvons difficilement augmenter la taille de nos amplicons, car avec des amplicons de 500 pb de bases nous atteignons les limites de séparation de la technique de PCR-DGGE.

3.1.2.3. Conclusion partielle

L'analyse par PCR-DGGE de l'ADN microbien présent sur le café du Mexique a été réalisée aux différentes étapes de trois traitements post-récolte : deux traitements par voie humide différant au niveau de l'étape de démucilagination et un traitement par voie sèche.

L'analyse statistique de similarité des gels DGGE réalisée après analyse d'image (Figure 3.1.13) permet de distinguer clairement l'influence des différents traitements sur les flores microbiennes présentes tout au long de ceux-ci. Les espèces fongiques et bactériennes sont nettement différentes en fonction de la finca et donc du traitement post-récolte utilisé. Il faut toutefois remarquer que les traitements ont été réalisés dans des lieux géographiques différents qui peuvent conditionner la flore originellement présente sur le café ainsi que celles qui se succèdent pendant le traitement.

L'observation des gels DGGE met en évidence 3 phases dans la succession des flores microbiennes au cours des traitements par voie humide. L'écosystème originel issu du champ est remplacé par un écosystème lié au process au cours du dépulpage et de la démucilagination puis par un autre, spécifique du séchage. Ces écosystèmes sont constitués d'espèces qui perdurent tout au long du traitement ou apparaissent alors que d'autres disparaissent. La présence d'un plus grand nombre d'espèces lors de la démucilagination par fermentation sous eau est liée à la nature du process qui favorise le développement microbien. Cette étape contribue par ailleurs à donner au café un profil aromatique qui le fait préférer aux autres par les consommateurs.

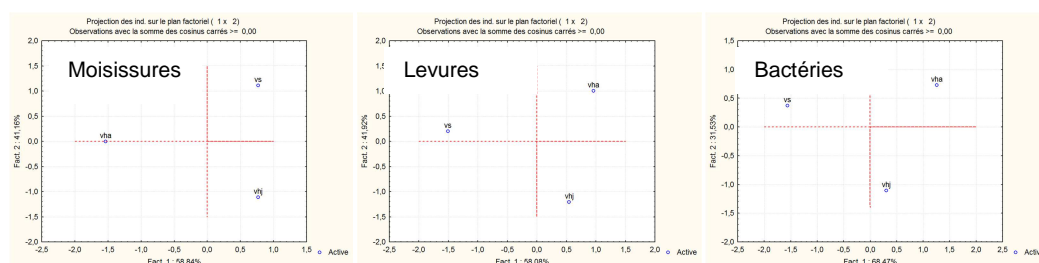


Figure 3.1.13 : Répartition des espèces microbiennes en fonction du traitement post-récolte (VHa : voie humide avec démucilagination mécanique- finca Andrade ; VHj : voie humide avec démucilagination par fermentation sous eau-finca Jocutla ; VS : voie sèche-finca Zongolica)

D'après Silva *et al.*, (2000) la microflore de la voie humide est plus abondante que celle de la voie sèche, ce qui est effectivement le cas en termes d'espèces microbiennes sur la finca Jocutla. Ils décrivent également que la microflore de la voie sèche est plus variée, ce qui n'est pas le cas sur la finca Zongolica et peut être lié à la qualité hygiénique des aires de séchage.

L'évolution de la biodiversité microbienne et surtout fongique est qualitativement et quantitativement plus réduite (souches plus voisines et dont le nombre varie peu en fonction des jours de séchage et du décorticage) lors du traitement par voie sèche au cours duquel peu d'évènements interviennent (Figure 3.1.14), notamment en termes de recyclage d'eau déjà contaminée.

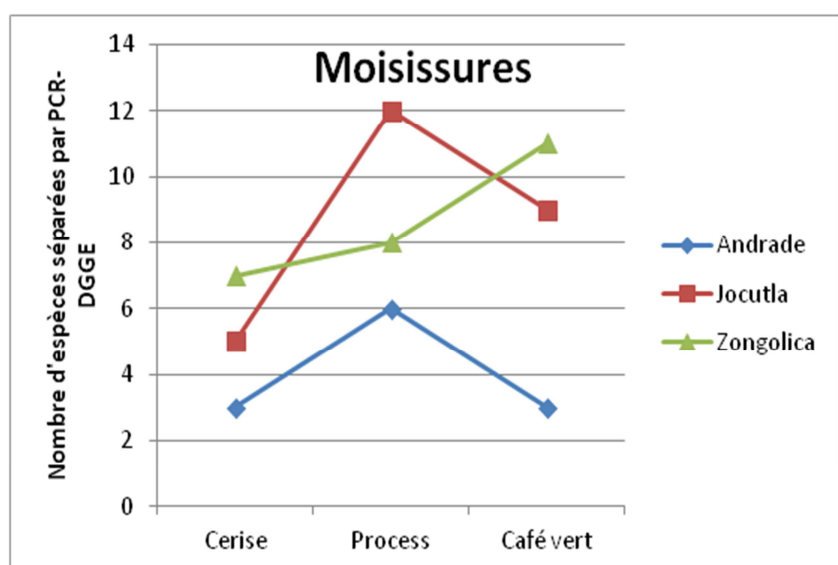
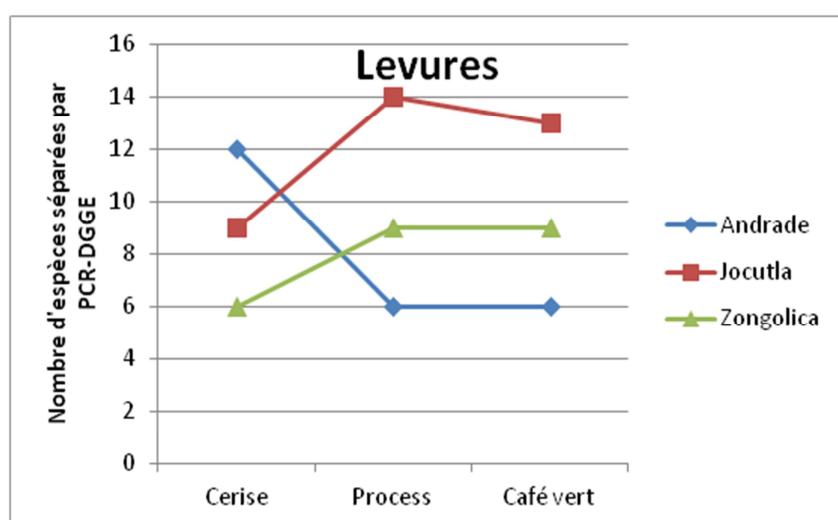
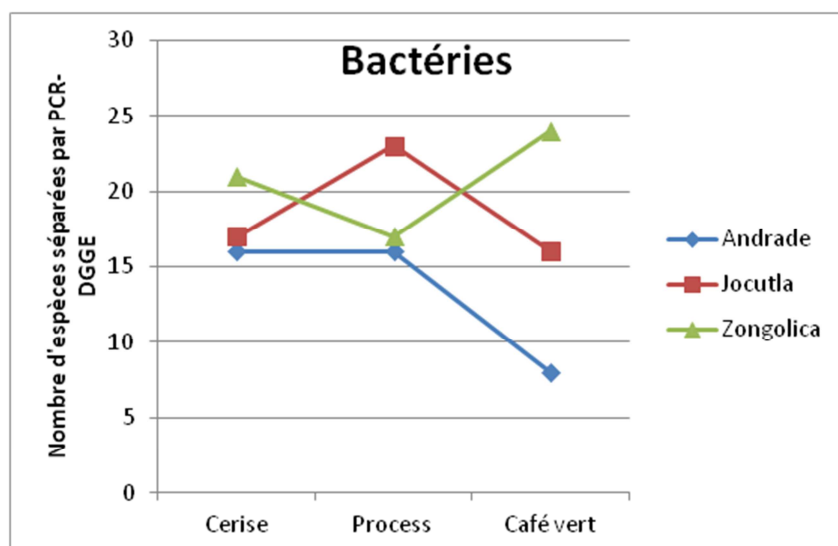


Figure 3.1.14 : Evolution quantitative des espèces des différentes flores microbiennes présentes sur le café en fonction des étapes du traitement post-récolte dans les trois fincas

Le but initial de cet essai était de comparer les flores sur des échantillons exempts d'OTA (année 1) puis de réaliser la même étude en présence d'une contamination artificielle avec une souche ochratoxinogène (année 2). L'inoculation artificielle sur site (Mexique) n'a pas abouti et n'a pu être retenue compte-tenu des délais de la thèse. La recherche d'une corrélation entre la biodiversité des moisissures présentes sur le café et la présence d'OTA a donc été entreprise sur des échantillons naturellement contaminés par la toxine en provenance du Cameroun et du Venezuela.

3.1.3. Etude de la flore fongique et production d'OTA sur du café du Cameroun et du Venezuela

3.1.3.1. Cameroun

Les 34 échantillons de café du Cameroun (Tableau 3.1.5) proviennent de 5 sites de zones géographiques différentes et ont été prélevés sur 2 années différentes (2009 et 2010). Les cafés de variétés Arabica ou Robusta ont été traités soit par voie sèche soit par voie humide par fermentation sous eau. L'OTA a été quantifiée pour chaque échantillon selon la méthode décrite dans le chapitre « Matériel et Méthodes » (cf 2.2.). Les teneurs en OTA mesurées s'inscrivent sur une échelle allant de « non détectable » ($<0.05 \mu\text{g/kg}$) à $248 \mu\text{g/kg}$ (échantillon 39/09). Selon Castellanos-Onorio *et al.* (2011) ce dernier café aurait une teneur résiduelle minimale en OTA après torréfaction d'environ $50 \mu\text{g/kg}$, ce qui représente 10 fois plus que la norme autorisée.

Tableau 3.1.5 : Caractéristiques des échantillons de café du Cameroun (vh : traitement par voie humide ; vs : traitement par voie sèche ; A : café arabica ; R : café robusta ; bfss : Bafoussam ; dsh : Dschang ; baf : Bafang ; mel : Melong ; san : Santchou ; nd : non détectable)

Ref	34/09	33/09	28/09	13/09	36/10	34/10	5/10	25/09	9/9	11/10	48/9	8/09	17/10	42/10	40/10	4/10	43/09
Traitement	vh	vh	vs	vs	vs	vh	vs	vs	vh	vs	vs	vs	vs	vh	vh	vh	vh
Variété	A	A	A	A	R	R	R	R	R	R	R	R	A	A	R	A	A
Région d'origine	dsh	dsh	dsh	dsh	dsh	dsh	dsh	baf	baf	baf	baf	baf	bfss	bfss	bfss	bfss	bfss
OTA µg/kg	155	31,2	nd	nd	nd	nd	nd	4	0,1	4,6	0,9	2,3	1,2	nd	10	nd	nd
Ref	39/09	39/10	14/09	42/09	39/10	27/10	11/09	10/09	45/09	25/10	26/10	46/09	48/10	51/10	44/09	6/09	12/10
Traitement	vh	vh	vh	vh	vh	vh	vh	vs	vs	vh	vs	vs	vh	vh	vs	vs	vs
Variété	A	A	A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Région d'origine	bfss	bfss	bfss	bfss	bfss	san	san	san	san	san	san	san	mel	mel	mel	mel	mel
OTA µg/kg	248	nd	0,2	nd	nd	0,8	0,6	nd	nd	2,8	0,9	0,4	nd	nd	nd	0,4	0,3

Une PCR-DGGE a été réalisée avec des amorces spécifiques des moisissures (U1f et U2f) sur l'ADN extrait des différents échantillons de café vert (Figure 3.1.15).

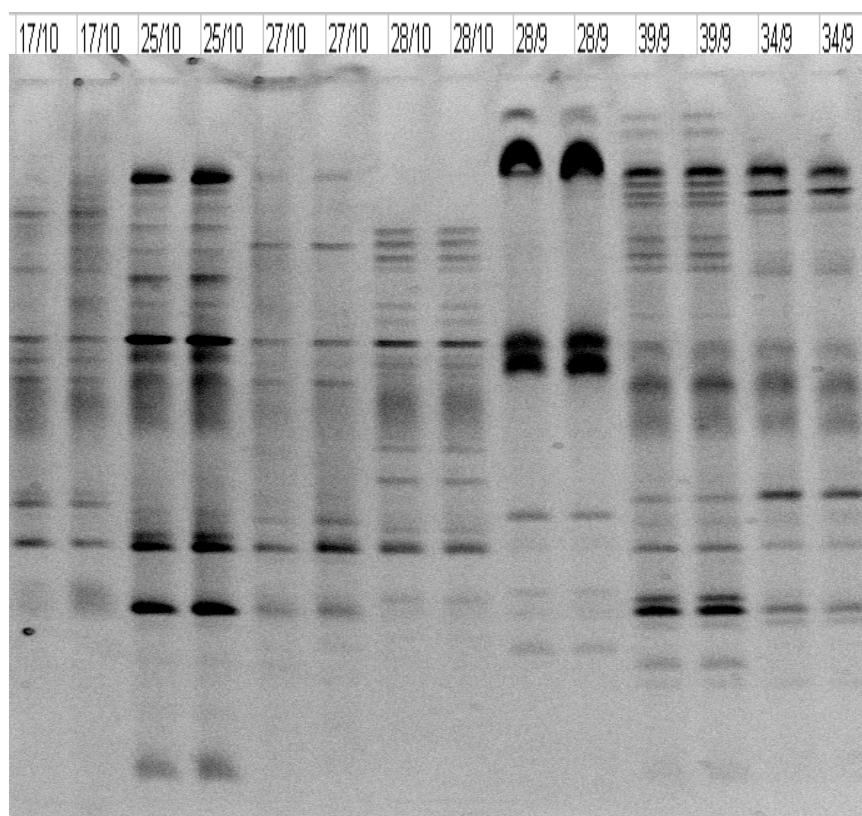


Figure 3.1.15 : Profils DGGE (ADNr de moisissures) d'échantillons de café vert provenant de différentes zones du Cameroun

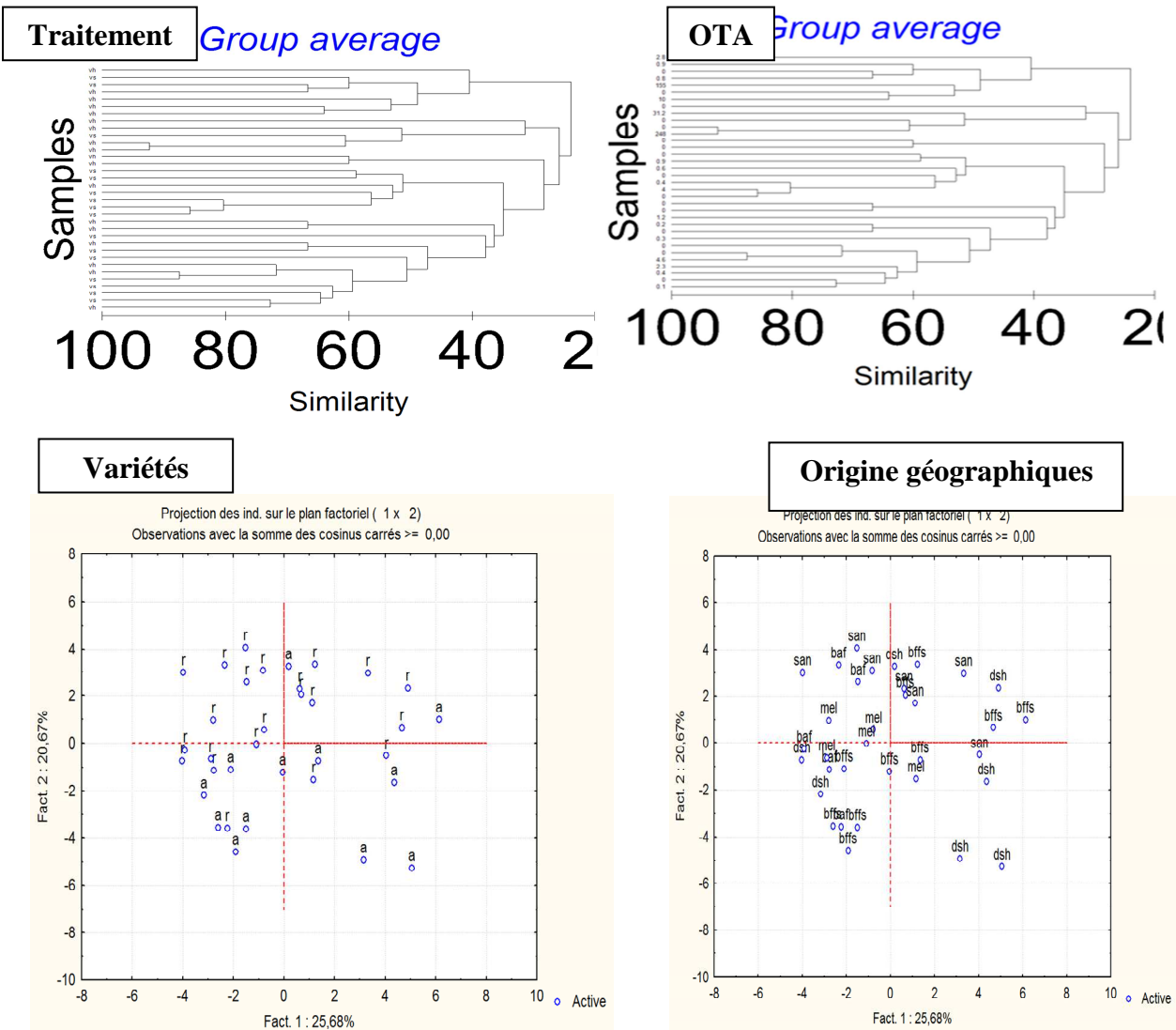


Figure 3.1.16 : Répartition des espèces de moisissures issues des échantillons du café du Cameroun en fonction du traitement, de la variété, de l'origine géographique et de la teneur en OTA (vh : traitement par voie humide ; vs : traitement par voie sèche ; A : café arabica ; R : café robusta ; bfss : Bafoussam ; dsh :Dschang ; baf : Bafang ; mel : Melong ; san :Santchou ; OTA en $\mu\text{g/kg}$; nd : non détectable)

Comme le montre l'analyse statistique de similarité réalisée après analyse d'image (Figure 3.1.16) l'interprétation des résultats ne permet d'établir aucune corrélation entre la flore des moisissures et l'origine géographique, la variété, le traitement ou la teneur en OTA.

Par rapport à la multiplicité des paramètres (4 dont un avec 5 niveaux) et leurs probables interactions, l'échantillonnage incomplet et déséquilibré ne permet pas une bonne interprétation des résultats (34 échantillons dont de nombreux en double ou en triple au lieu de 40 différents).

De plus, trop de paramètres influent en même temps sur l'écologie microbienne (comme cela a été montré pour le café du Mexique) pour définir une relation simple entre les paramètres et la teneur en OTA.

3.1.3.2. Venezuela

Les 22 échantillons de café du Vénézuéla (Tableau 3.1.6) proviennent de 2 sites de même zone géographique et 12 fincas différentes. Les cafés de variétés Arabica ont été traités par voie humide par fermentation sous eau mais selon 2 protocoles qui correspondent à l'obtention de 2 qualités de café différentes : le café « conventional » de qualité courante plutôt médiocre et le café « Grano de Oro » de haute qualité. L'OTA a été quantifiée pour chaque échantillon selon la méthode décrite dans le chapitre « Matériel et Méthodes » (cf 2.2.).

Les teneurs en OTA mesurées s'inscrivent sur une échelle allant de « non détectable » ($<0.05 \mu\text{g/kg}$) à $460 \mu\text{g/kg}$ (échantillon C13). Selon Castellanos-Onorio *et al.* (2011), ce café destiné à la consommation locale et non à l'exportation aurait une teneur résiduelle minimale en OTA après torréfaction d'environ $90 \mu\text{g/kg}$, ce qui représente presque 20 fois plus que la norme autorisée. Il faut toutefois remarquer que, hormis cet échantillon, tous les autres ont une teneur en OTA inférieure à $6.3 \mu\text{g/kg}$.

Tableau 3.1.6 : Caractéristiques des échantillons de café du Venezuela (C ou conv : « conventional »; O ou G.O : « Grano de Oro »; nd :non détectable)

REF	Localidad	Finca	Proprietario	typo café	OTA µg/kg
C1	Chabasquen	Cruz Verde	Jose molina	Conv	nd
O2	Biscucuy	Las Flores	Jesus Hernandez	G.O	1
O3	Biscucuy	Buena Vista	Coromoto Barazarte	G.O	0,1
C4	Biscucuy	Santa Rita	Rafael Camargo	G.O	nd
O5	Biscucuy	Buena Vista	Coromoto Barazarte	Conv	nd
C6	Biscucuy	Esperanza	Zacarias Catire	Conv	0,1
O7	Biscucuy	Esperanza	Zacarias Catire	G.O	nd
C8	Chabasquen	La Palma	Luciano Gomez	Conv	nd
O9	Biscucuy	Santa Rita	Rafael Camargo	G.O	nd
O10	Biscucuy	Alto piedra	Olegario Guanda	G.O	0,2
C11	Chabasquen	Peña Blanca	Jairo Lucena	Conv	0,3
C12	Biscucuy	La Vega	José Gonzalez	Conv	3
C13	Biscucuy	Buena Vista	Coromoto Barazarte	Conv	460
O14	Biscucuy	Coop G.O	Coop G.O	G.O	1,5
C15	Biscucuy	Santa Rita	Rafael Camargo	Conv	4,7
C16	Biscucuy	San Rafael	Pedro Garcia	Conv	2
O17	Biscucuy	Alto piedra	Olegario Guanda	G.O	0,4
C18	Biscucuy	Esperanza	Zacarias Catire	Conv	0,2
C19	Biscucuy	San Rafael	Pedro Garcia	Conv	6,3
C20	Chabasquen	Alcade/Cerro Seco	Osvaldo Zerpa	Conv	0,1
C21	Biscucuy	Coop G.O	Coop G.O	G.O	nd
C22	Biscucuy	La Vega	José Gonzalez	Conv	0,5

Une PCR-DGGE a été réalisée avec des amorces spécifiques des moisissures (U1f et U2f) sur l'ADN extrait des différents échantillons de café vert (Figure 3.1.17).

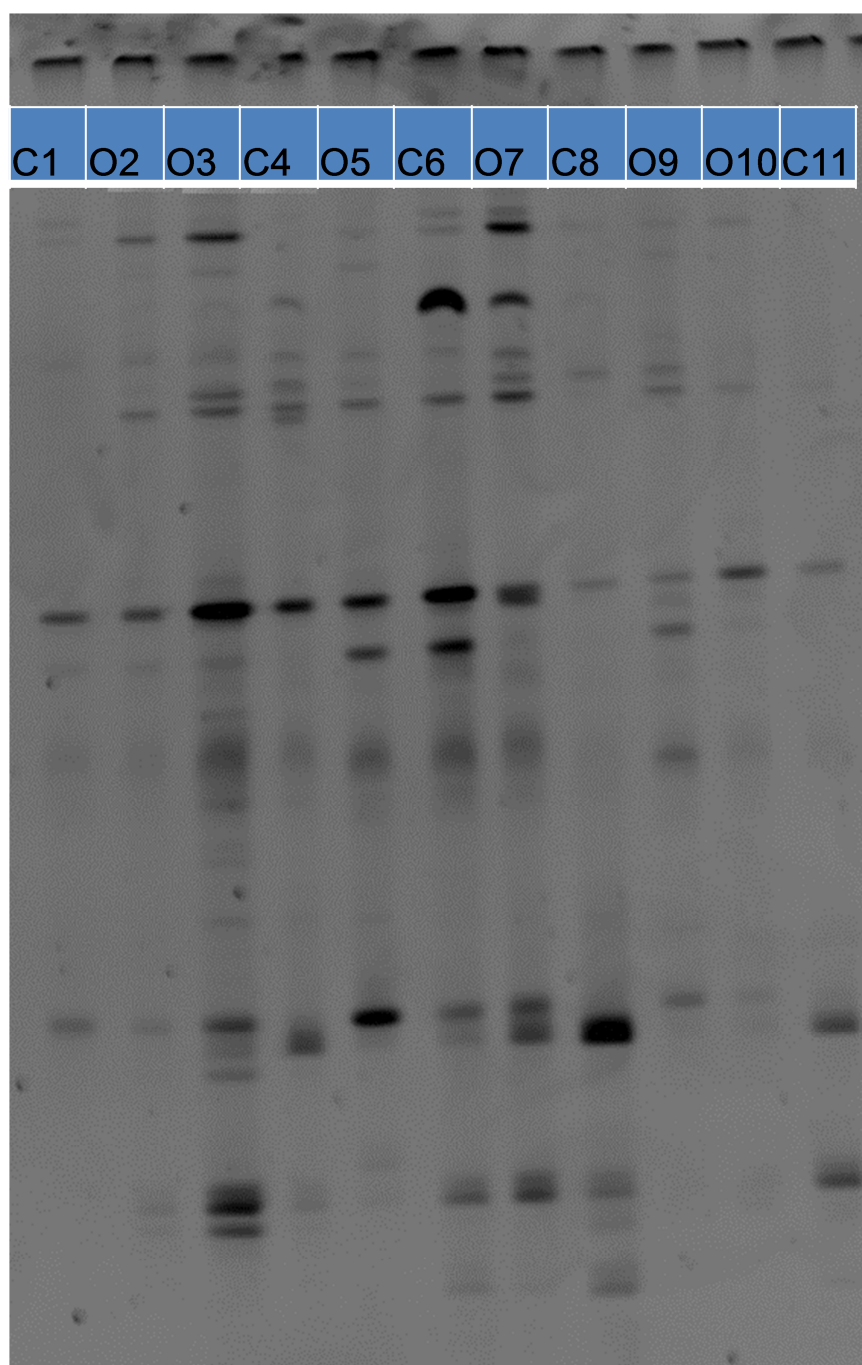


Figure 3.1.17 : Profils DGGE (ADNr de moisissures) d'échantillons de café vert provenant de la zone de Biscucuy au Vénézuéla (C : « conventional »; O : « Grano de Oro »)

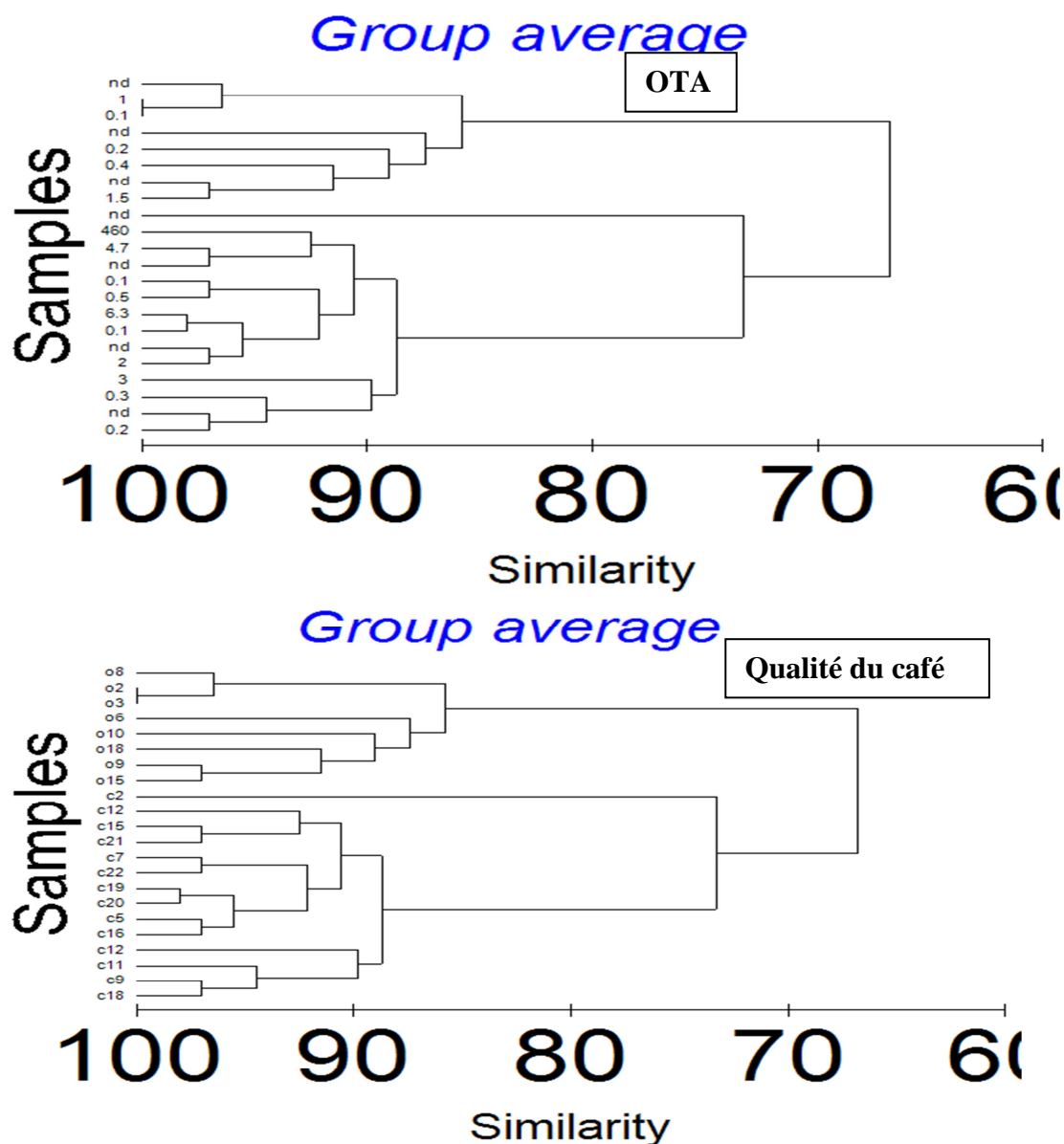


Figure 3.1.18 : Dendrogramme de similarité des espèces de moisissures issues des échantillons du café du Venezuela en fonction de la qualité du café et de la teneur en OTA (C ou conv : « conventional »; O ou G.O : « Grano de Oro »; OTA en $\mu\text{g/kg}$; nd : non détectable)

L'analyse de similarité (Figure 3.1.18) sur les flores fongiques obtenue par analyse d'image des gels DGGE permet de différencier les 2 qualités de café regroupés en deux clusters distincts dont la similarité atteint encore 65%.

Par contre l'analyse ne permet pas d'obtenir une relation entre le profil DGGE des moisissures et la teneur en OTA des échantillons.

3.1.4. Conclusion

La méthodologie PCR-DGGE, dans les conditions de notre étude, ne nous a pas permis de relier le taux d'OTA à un profil DGGE de moisissures. D'une part les essais initialement prévus au Mexique n'ont pas pu aboutir. Dans un second temps, les échantillons du Cameroun se sont révélés trop disparates pour permettre un traitement statistique correct. Pour les échantillons du Vénézuëla nous n'avons pas pu établir de corrélation entre la contamination du café par l'OTA et le profil DGGE des moisissures. Plusieurs phénomènes peuvent expliquer la difficulté à montrer cette relation comme par exemple la co-migration de certaines espèces d'*Aspergillus*. De plus nous savons que la production d'OTA par les souches productrices n'est pas systématique mais liée aux conditions physiologiques et environnementales. Par ailleurs il existe parmi les espèces ochratoxinogènes des niveaux de production très différents comme c'est le cas pour *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *A. niger* et *A. carbonarius*.

Les essais d'identification moléculaire par séquençage des souches en utilisant les amplicons séparés par DGGE et en comparant les distances de migration par rapport à des témoins (souches pures) n'ont pas donné de résultats satisfaisants en raison des problèmes de co-migration évoqués plus haut et de la taille trop restreinte du fragment séquencé.

Malgré ces restrictions, cette étude a montré que la PCR- DGGE pouvait être un outil performant pour suivre qualitativement et quantitativement la biodiversité et la dynamique des flores microbiennes impliquées dans les procédés technologiques. En effet la méthodologie utilisée nous a permis de différencier les différentes étapes des traitements post-récolte du café par rapports aux profils DGGE obtenus pour chaque type de microorganismes. De plus une différenciation obtenue entre les fincas est sûrement liée à la fois au type de traitement ainsi qu'à la zone géographique. D'une manière générale les résultats obtenus au cours de cette étude vont dans le même sens que ceux décrits par Masoud *et al.* (2004) et Silva *et al.* (2000 et 2008a).

3.2. Mise au point d'une méthode moléculaire de différenciation spécifique de *Aspergillus ochraceus* / *Aspergillus westerdijkiae*

A.ochraceus et *A. westerdijkiae* font partie des espèces liées à la présence de l'ochratoxine A (OTA) dans le café. Depuis 2004, sur la base de données moléculaires et morphologiques Frisvad et al ont proposé *A. westerdijkiae* comme nouvelle espèce séparée du taxon *A.ochraceus*. Plusieurs isolats anciennement identifiés comme *A.ochraceus* ont été reclassés comme *A.westerdijkiae*. Il s'avère que les niveaux de production d'OTA de ces deux espèces sont aussi très différents. *A.ochraceus* est maintenant considéré comme faiblement producteur, tandis que *A.westerdijkiae* est considéré comme un des plus importants producteurs (Gil-Serna et al., 2011b). Certaines souches très productrices avaient antérieurement été identifiées comme *A. ochraceus*

De plus, ces deux espèces n'ayant été différenciées que récemment, les paires d'amorces ADN dessinées jusqu'à présent ne sont pas spécifiques de chaque espèce, c'est-à-dire qu'elles permettent amplifier par PCR une région génomique de même taille pour les deux, ou bien elles sont trop spécifiques, et dans ce cas n'amplifient sélectivement l'ADN que d'une seule espèce.

Ainsi, avec les primers de séquences de la région ITS1/ITS2 de l'ADN ribosomal, il est difficile de différencier *A.ochraceus* et *A.westerdijkiae* par ce type d'amplifications.

Par contre, les séquences de gènes spécifiques de la β tubuline (Samson et al., 2004 ; Varga et al., 2007) ne vont amplifier que l'ADN d'*A.westerdijkiae*.

A ce jour il est donc difficile de distinguer ces deux espèces avec un seul jeu d'amorces ADN. L'objectif de notre étude est d'utiliser les propriétés de la PCR-DGGE pour séparer *A.ochraceus* et *A.westerdijkiae*. La DGGE permet de séparer des fragments d'ADN de taille identique mais avec des séquences différentes. La séparation est basée sur la mobilité électrophorétique de l'ADN double brin dans un gel de polyacrylamide contenant un gradient linéaire croissant d'agents dénaturants (urée et formamide). La dynamique de dénaturation d'ADN double brin est fonction de sa composition en bases AT (Adénine-Thymine, deux doubles liaisons) et GC (Guanine-Cytosine, trois doubles liaisons). Ainsi chaque séquence possède une

dynamique de dénaturation qui lui est propre et qui va définir son niveau de migration dans le gel en conditions dénaturantes

Une résolution optimale est obtenue quand les fragments ne sont pas totalement dénaturés. Pour éviter la dénaturation totale du double brin, une structure à très haute température de fusion (riche en GC) nommée GC clamp est associée lors de l'amplification par PCR. L'amplification par PCR est alors réalisée avec l'amorce sens portant en 5' une séquence de 40 GC : le GC clamp (Sheffield *et al.*, 1989). La méthodologie envisagée consiste à utiliser des amorces « universelles » permettant d'amplifier par PCR l'ADN des deux espèces, ayant des produits d'amplification de tailles identiques, comme par exemple de la région ITS1/ITS2, et d'utiliser la technique DGGE pour les séparer et les comparer à des souches de référence *A.ochraceus* et *A.westerdijkiae*. Nous avons donc utilisé les amorces OCA (région ITS1/ITS2) (Sartori *et al.*, 2006) sur lesquelles nous avons ajouté un GC clamp.

Les souches *Aspergillus ochraceus* CBS 108.08, *Aspergillus westerdijkiae* CBS 112803 et *Aspergillus westerdijkiae* MULC 44640 ont été utilisées comme souches de référence. Les autres souches de moisissures de la section Circumdati utilisées au cours de ce travail ont été isolées à partir de café provenant de la Finca Jocutla (Veracruz, Mexique) suivant un traitement de type voie humide (Tableau 3.2.1). Elles ont été sélectionnées et purifiées par l'équipe du professeur Mirna Suarez de l'institut technologique de Veracruz (ITV). Elles sont phénotypiquement très proches de la souche témoin *Aspergillus westerdijkiae* MULC 44640 anciennement identifiée comme *A.ochraceus*.

Tableau 3.2.1 : Références des souches utilisées pour la différenciation *A.ochraceus* et *A.westerdijkiae*.

Ref	Ref NCBI/CBS	Ref ITV
AO	<i>Aspergillus ochraceus</i> CBS 108.08	
AW	<i>Aspergillus westerdijkiae</i> CBS 112803	
1	<i>Aspergillus westerdijkiae</i> MULC 44640	
2	HQ843034.1	ITV-AsCV
3	HQ843030.1	ITV-AsCBc
4	HQ843035.1	ITV-AsCBa
5	HQ843032.1	ITV-AsCP55
6	HQ843031.1	ITV-CP51
7	HQ843033.1	ITV-AsCS

3.2.1. Production d'OTA

Pour chacune des souches utilisées dans l'étude les niveaux de productions d'OTA ont été mesurés sur milieu PDA pH 3.5 pendant 7 jours. L'extraction de l'OTA à partir des milieux de cultures et la quantification ont été effectuées selon la méthode proposée par Bragulat *et al.*, (2001) Suarez *et al.*, (2004 a,b) modifiée et décrite dans les paragraphes 2.2 et 2.4.2.3.

Les résultats sont présentés sur la Figure 3.2.1.

Trois des souches issues du café (3, 4 et 7) ont des niveaux élevés de production d'OTA à 7 jours de culture, comparables ou même supérieurs à celui de la souche référence 1. Les trois autres produisent l'OTA à un niveau légèrement inférieur mais avec des valeurs qui restent quand même bien supérieures à celles atteintes par les souches d'*A.ochraceus* (cf chapitre 3.3) (Bacha *et al.*, 2009; Frisvad *et al.*, 2004; Samson *et al.*, 2006).

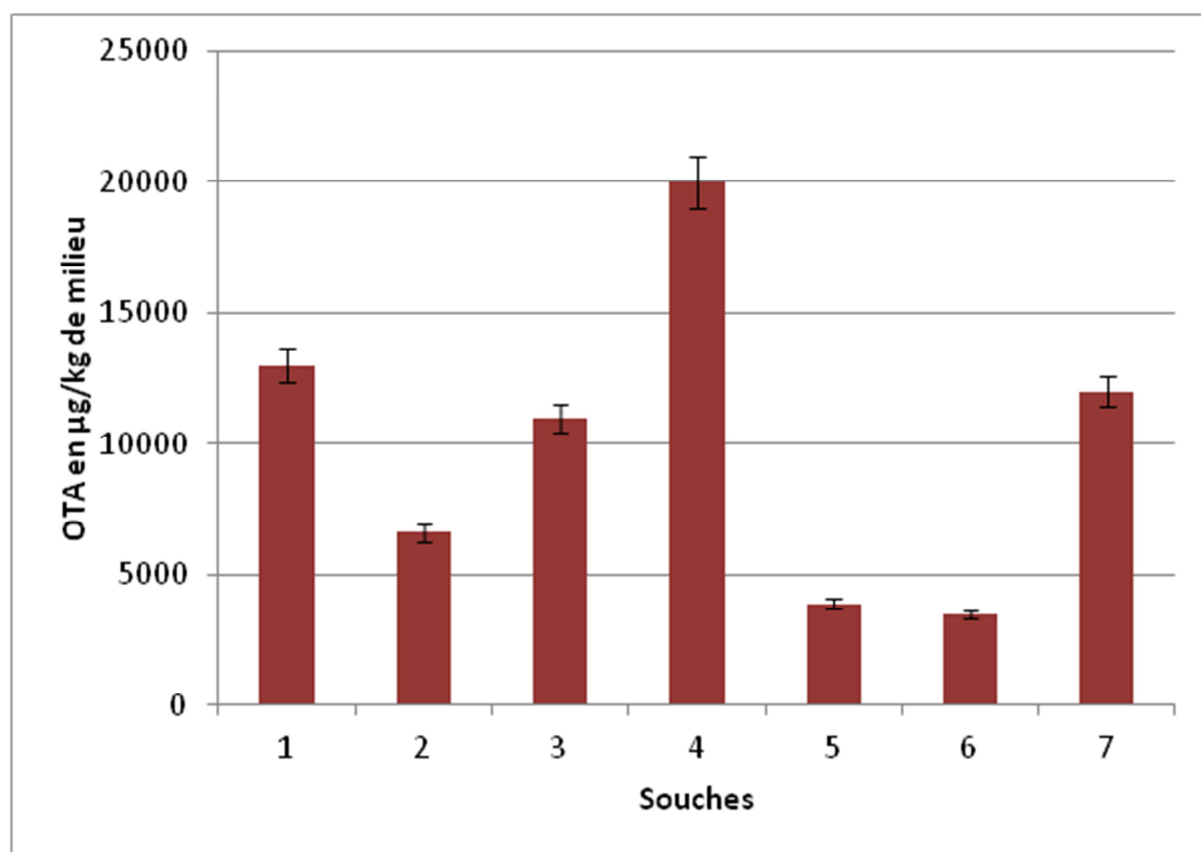


Figure 3.2.1 : Production d'OTA à 7 jours sur milieu PDA pH 3.5, par la souche référence *Aspergillus westerdijkiae* MULC 44640 (souche 1) et les souches isolées du café (souches 2 à 7).

La production importante d'OTA de ces souches permet d'orienter l'identification de celles-ci vers l'espèce *Aspergillus westerdijkiae* plutôt que vers l'espèce *A.ochraceus*.

Les outils de biologie moléculaire proposés ci-dessus (PCR-DGGE) ont été utilisés dans la suite de cette étude pour confirmer cette hypothèse.

3.2.2. Séparation par PCR-DGGE

Dans cette partie nous avons tout d'abord confirmé avec des primers spécifiques à *A.westerdijkiae* l'identification de souches isolées du café. Ensuite nous avons obtenu la séparation d'*Aspergillus westerdijkiae* et d'*A.ochraceus* à l'aide de la technique de DGGE.

3.2.2.1. PCR

Deux types de PCR ont été réalisés, dans le but :

- D'identifier à l'aide d'amorces spécifiques à l'espèce *A.westerdijkiae* les souches à tester à l'aide des amorces β tub (Morello et al., 2007) utilisées habituellement.
- D'amplifier à l'aide d'amorces « peu spécifiques » (amplification de *A.ochraceus* et *A.westerdijkiae* suivant amorces décrites par Sartori et al., 2006) à l'espèce *A.westerdijkiae* l'ensemble des fragments issus de l'extraction des ADN génomiques des souches à tester afin de les séparer ultérieurement par DGGE.

L'ADN génomique purifié est amplifié par PCR avec les amorces détaillées dans le Tableau 3.2.2, et déterminées soit par la technique de Sartori et al. (2006) pour *A. ochraceus* et *Aspergillus westerdijkiae*, soit par la technique de Morello et al. (2007) pour *A.westerdijkiae*. Les conditions d'amplification par PCR sont décrites dans le chapitre « Matériels et Méthodes » (cf 2.3.2.1.).

Tableau 3.2.2 : Amorces pour l'amplification de l'ADN génomique de, *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*.

<i>Aspergillus westerdijkiae</i>	Bt2Aw-F	5`-TGA TAC CTT GGC GCT TGT GAC G – 3`
	Bt2Aw-R	5`- CGG AAG CCT AAA AAA TGA AGA G- 3`
<i>Aspergillus ochraceus</i> et <i>Aspergillus westerdijkiae</i>	OCA_DGGE-F (Sigma, France)	5`- <u>CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG</u> <u>GCG</u> ATA CCA CCG GGT CTA ATG CA – 3`
	OCA-R (Sigma, France)	5`- TGC CGA CAG ACC GAG TGG ATT- 3`

Le contrôle des produits de PCR de l'amplification à l'aide des amorces Bt2Aw (Figure 3.2.2) montre une amplification de l'ordre de 370 pb pour les souches de 1 à 7, ainsi que pour la souche *A.westerdijkiae* CBS 112803. Par contre aucune amplification n'est obtenue pour la souche *A.ochraceus* CBS 10808 et le témoin négatif (TnPW : milieu réactionnel sans ADN).

Le contrôle des produits de l'amplification par PCR à l'aide des amorces OCA_DGGE montre une bonne amplification de l'ordre de 260 pb, pour les souches de 1 à 7, ainsi que pour les souches *A.westerdijkiae* CBS 112803 et *A.ochraceus* CBS 10808. Aucune amplification n'est observée pour le témoin négatif (TnPO : milieu réactionnel sans ADN).

Ces résultats confirment l'hypothèse que les souches 2 à 7 extraites du café mexicain appartiennent bien à l'espèce *A.westerdijkiae*.

Au cours de l'étape suivante les fragments amplifiés par PCR à l'aide des amorces OCA_DGGE (avec GC clamp) ont été utilisés pour tester une séparation spécifique de ces fragments par DGGE.

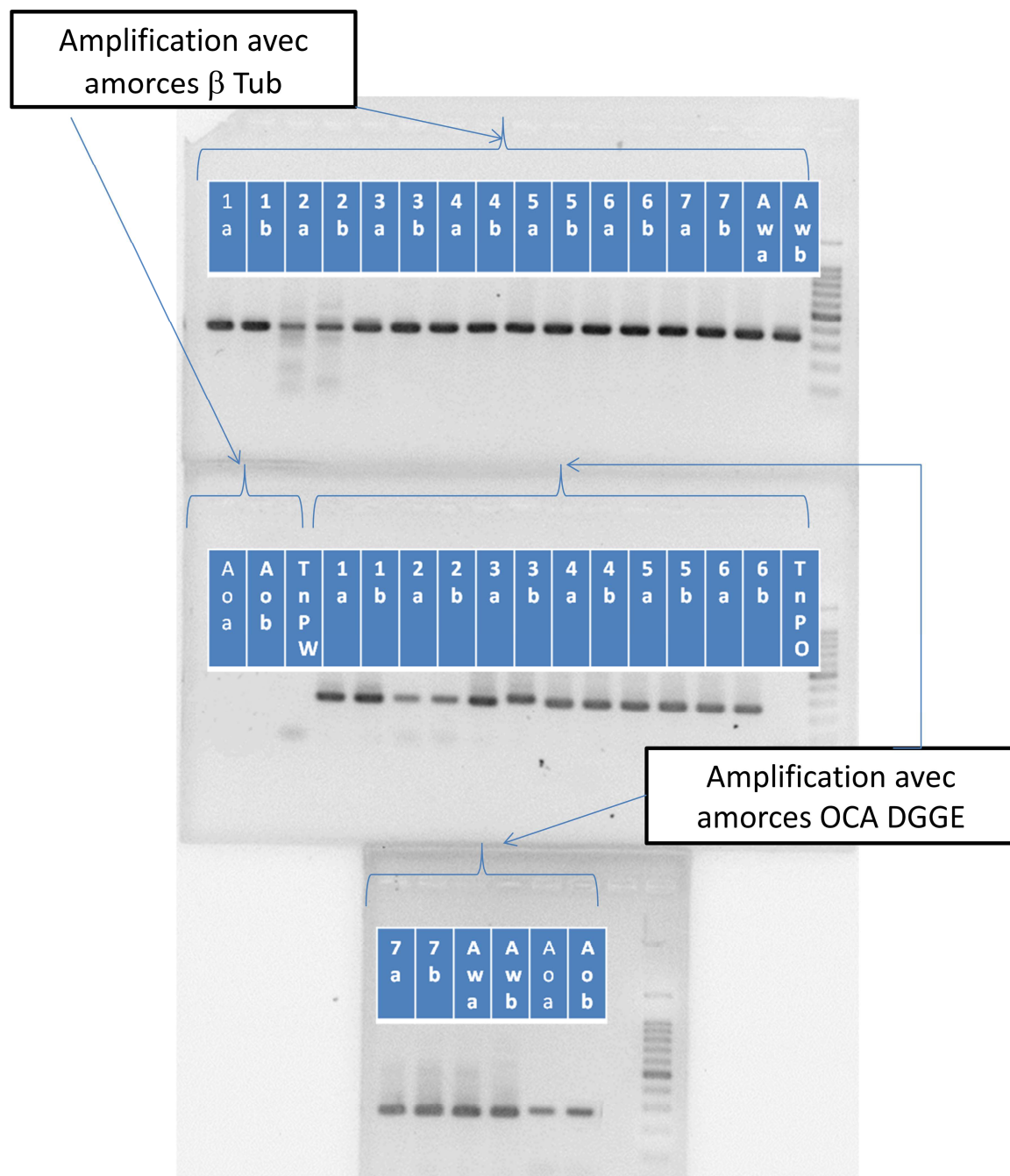


Figure 3.2.2 : Contrôle des produits PCR après amplification à l'aide des amorces β tub et OCA_DGGE

3.2.2.2. DGGE

Le résultat de la DGGE réalisée sur les amplicons issus des ADN extraits des souches à identifier avec les amorces OCA_DGGE selon la méthode décrite dans le chapitre « Matériels et Méthodes » (cf 2.3.2.1.) est présenté sur la Figure 3.2.3

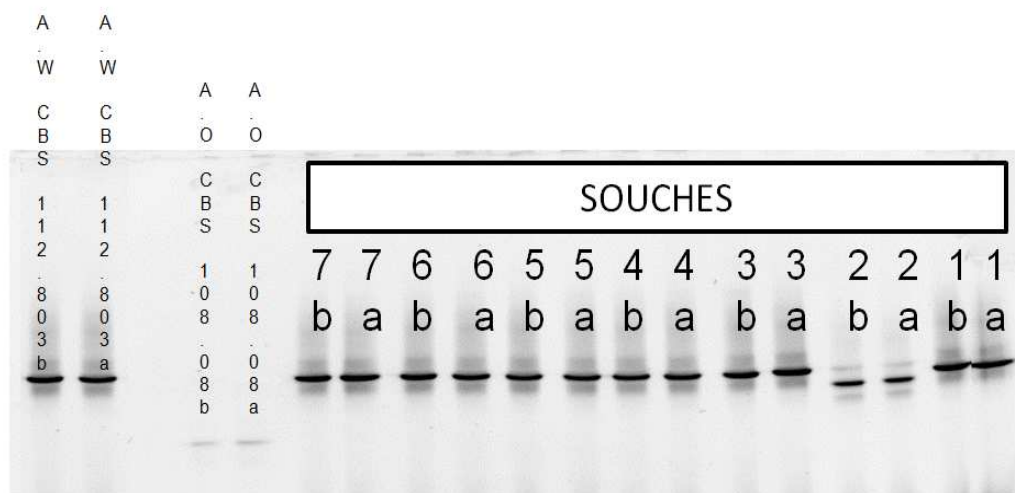


Figure 3.2.3 : Séparation par PCR-DGGE des amplicons à l'aide des amorces OCA_DGGE pour les souches de référence *Aspergillus westerdijkiae* CBS 112.803, *Aspergillus westerdijkiae* MULC 44640 (souche 1) *Aspergillus ochraceus* CBS 108.08 et isolées du café (2 à 7 en duplicat).

Il apparaît qu'il est possible de différencier les espèces *A.westerdijkiae* (distance de migration $R_f = 293 \pm 2$) et *A.ochraceus* ($R_f = 365 \pm 2$) par cette méthode. En effet les bandes représentatives des deux espèces de référence ont des positions significativement différentes.

Les bandes correspondantes aux souches 1, 3, 4, 5, 6 et 7 se trouvent à la même distance ($R_f = 293 \pm 4$) que les bandes des deux références *A.westerdijkiae* ($R_f = 293 \pm 2$). Ce résultat est en concordance avec le résultat obtenu avec l'identification grâce aux amorces Bt2Aw, ce qui nous amène à penser que les souches 1, 3, 4, 5, 6 et 7 sont *A.westerdijkiae*.

La bande correspondant à la souche 2 est positionnée à une distance intermédiaire ($R_f = 330 \pm 2$) située entre les références *A.westerdijkiae* ($R_f = 293 \pm 2$) et *A.ochraceus* ($R_f = 365 \pm 2$). Toutefois cette bande est plus proche de la référence *A.westerdijkiae* que de *A.ochraceus*, de plus elle a été aussi amplifiée à l'aide des amorces spécifiques à *A.westerdijkiae* (Bt2Aw), ce qui laisse penser qu'elle est du type *A.westerdijkiae*.

Il apparaît bien que les souches 1 à 7 sont bien des espèces d'*A. westerdijkiae*.

Afin de confirmer ces résultats, les produits d'amplifications des différentes souches (références et isolées du café) ont été séquencés.

3.2.3. Séquençage

Les produits de PCR utilisés pour cette séparation par DGGE ont été envoyés pour séquençage chez GATC Biotech (Allemagne). Le séquençage a été effectué sur chaque duplicat des produits PCR. Les séquences obtenues ont été alignées à l'aide du logiciel BioEdit (Sequence Alignment Editor version 7.1.3.0) suivant ClustalW Multiple Alignment (Thompson *et al.*, 1994).

Comparaison des séquences Forward (sens) :

Tout d'abord, les séquences Forward (sens) ont été alignées et comparées en utilisant comme référence l'échantillon *Aspergillus westerdijkiae* CBS 112.803a (Figure 3.2.4).

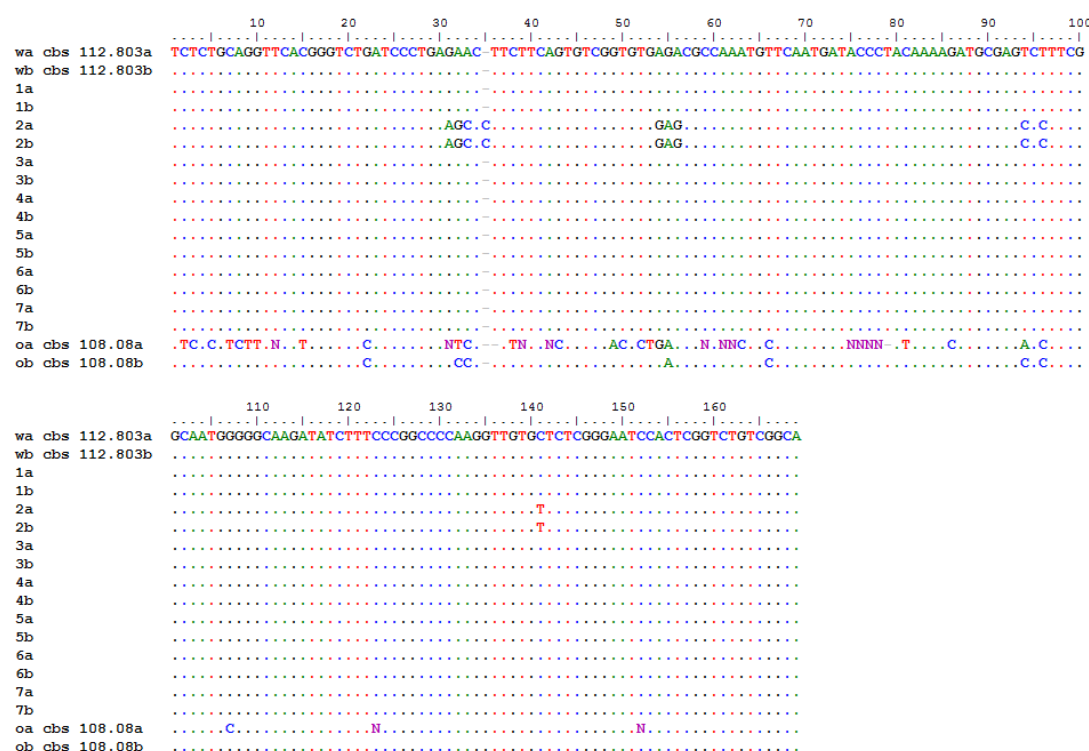


Figure 3.2.4 : Alignement et comparaison des séquences (sens) Forward des souches de référence *Aspergillus westerdijkiae* CBS 112.803 et *Aspergillus ochraceus* CBS 108.08 et des souches isolées du café.

Les résultats du séquençage montrent une bonne reproductibilité entre tous les duplicats. Sur 170 nucléotides comparés nous avons 100% d'homologie entre les

souches 1, 3, 4, 5, 6, 7 et la souche de référence *Aspergillus westerdijkiae* CBS 112.803.

Par rapport à l'échantillon B de *Aspergillus ochraceus* CBS 108.08, 7 nucléotides sont différents dont 6 bases C supplémentaires par rapport à la référence *Aspergillus westerdijkiae*. Trois transversions de G → C et 3 transitions de T → C et une transition de G → A sont observées.

Entre la souche de référence *Aspergillus westerdijkiae* CBS 112.803 et la souche 2, 9 nucléotides sont différents : 2 transitions de G → A, 4 de A → G, 2 de T → C et une de C → T, plus une insertion de C. La comparaison entre la souche 2 et la souche de référence *Aspergillus ochraceus* CBS 108.08, montre également 7 modifications de séquence. Deux transversions de G → C, 2 transitions de G → A et 2 transitions de T → C ainsi qu'une délétion de C sont observées. Tous ces résultats sont en totale concordance avec les résultats obtenus par séparation DGGE, qui montrait une migration identique pour les souches dont la séquence est la même.

Comparaison des séquences Reverse (Antisens):

Les séquences Reverse ont été alignées et comparées en utilisant comme référence l'échantillon *Aspergillus westerdijkiae* CBS 112.803a (Figure 3.2.5).

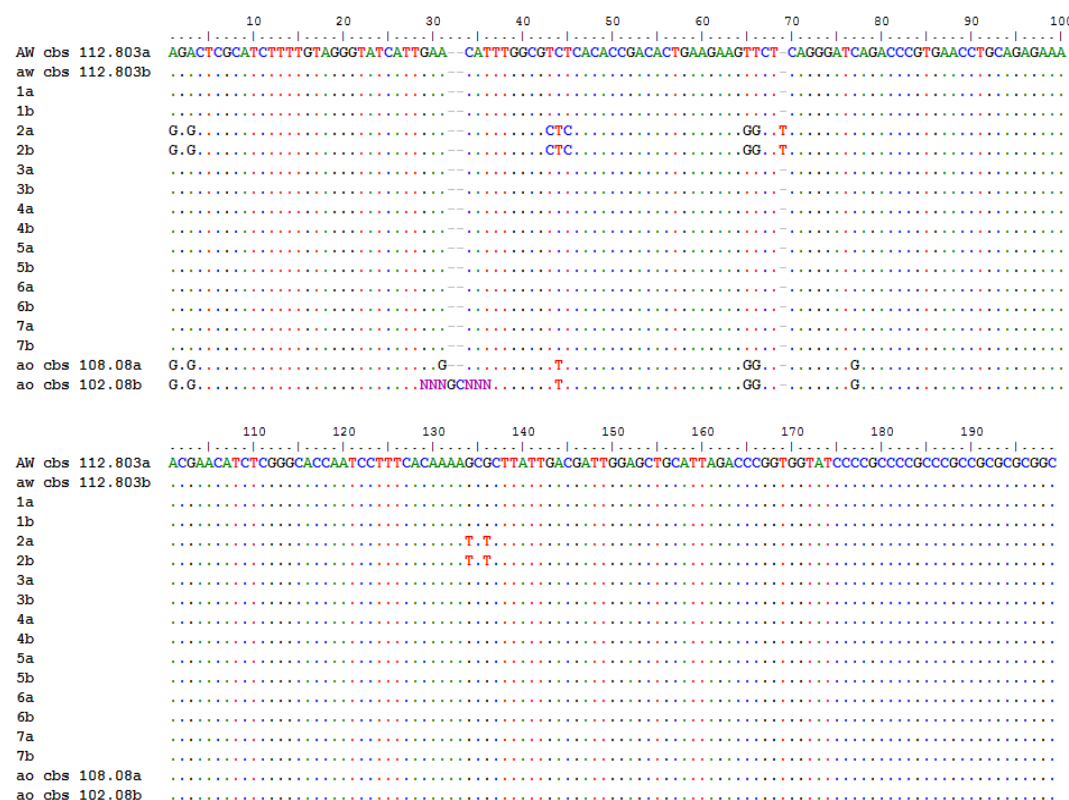


Figure 3.2.5 : Alignement et comparaison des séquences (anti sens) Reverse des souches de référence *Aspergillus westerdijkiae* CBS 112.803 et *Aspergillus ochraceus* CBS 108.08 et des souches isolées du café.

Les résultats de séquençage montrent une bonne reproductibilité entre tous les duplicats. Sur 200 nucléotides comparés nous avons 100% d'homologie entre les souches 1, 3, 4, 5, 6, 7 et la souche de référence *Aspergillus westerdijkiae* CBS 112.803.

Pour les souches de référence *Aspergillus ochraceus* CBS 108.08 et *Aspergillus westerdijkiae* CBS 112.803, 7 nucléotides sont différents : 2 transitions de A → G et une de C → T ainsi que 2 transversions de T → G et 1 de C → G.

Entre la souche de référence *Aspergillus westerdijkiae* CBS 112.803 et la souche 2, 10 nucléotides sont différents. Deux transitions de A → G, 2 de T → C, une de C → T puis 2 transversions de T → G, 2 de G → T et une insertion de T sont observées. Entre la souche 2 et la souche de référence *Aspergillus ochraceus* CBS 108.08, 7 modifications de séquences sont observées : 2 transitions de C → T et une de A → G, 2 transversions de T → G et une de C → G ainsi qu'une délétion de T.

Ces résultats confirment les résultats obtenus avec les séquençages des séquences Forward (sens).

3.2.4. Conclusion partielle

La méthodologie proposée a permis de mettre au point une méthode innovante et simple permettant de différencier deux souches ochratoxinogènes contaminantes du café, *Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus westerdijkiae*. Ces deux souches sont phénotypiquement et génomiquement très proches et l'une est fortement productrice d'OTA (*A.westerdijkiae*) alors que l'autre ne l'est que faiblement. Les résultats ont été confirmés grâce aux séquençages réalisés sur les produits d'amplification par PCR des souches. Le principal avantage de la méthode est de n'utiliser qu'un seul jeu d'amorces pour différencier *A.westerdijkiae* de *A.ochraceus* et ainsi accéder plus rapidement à un diagnostic sur la capacité toxino-gène des souches analysées.

Afin de consolider la spécificité de la technique il conviendrait de tester celle-ci avec un plus grand nombre de souches de ces deux espèces ainsi qu'avec des souches d'espèces différentes (*Aspergillus steynii*).

Les résultats de ces essais permettraient de confirmer la possibilité d'étudier la biodiversité des souches de *A.westerdijkiae* et de *A.ochraceus* par cette méthode (distance de migration intraspécifiques et donc séquences différentes). Dans la suite de cette étude, nous avons utilisé cette méthodologie dans l'optique d'accéder à une « quantification » différentielle des deux souches *Aspergillus westerdijkiae* et *Aspergillus ochraceus*, qui sont visuellement indiscernables.

3.2.5. Application de la PCR-DGGE à la quantification d'*Aspergillus westerdijkiae* et *Aspergillus ochraceus*.

La quantification différentielle des ADN de *Aspergillus westerdijkiae* et *Aspergillus ochraceus* fait partie intégrante de l'étude de la biodiversité de ces souches qu'il est difficile de différencier visuellement. La PCR quantitative est utilisable mais donnerait des informations tronquées. En effet, par les méthodes existantes (Morello *et al.*, 2007 ; Sartori *et al.*, 2006), nous n'aurions que la quantification d'*Aspergillus westerdijkiae* ou bien nous quantifierons en même temps *Aspergillus westerdijkiae* et *Aspergillus ochraceus*.

L'avantage d'utiliser la PCR-DGGE suivant le protocole établi dans ce chapitre est que nous pourrions quantifier simultanément les deux espèces. Des études ont été réalisées avec succès sur ce type d'essais (Felske *et al.* 1998; Brüggemann *et al.* 2000; Pintado *et al.*, 2003 ;Portillo *et al.* 2007 ; Portillo et Gonzalez, 2008).

Afin de vérifier la faisabilité de la méthode de quantification dans nos conditions d'expériences, la linéarité puis la répétabilité des résultats obtenus ont été vérifiés.

3.2.5.1. Linéarité

A partir d'ADN génomique provenant de souches pures d'*Aspergillus westerdijkiae* CBS 112.803 et *Aspergillus ochraceus* CBS 108.08, des amplifications par PCR (dans les conditions précisées dans le paragraphe 2.3.2.1.) à l'aide des amorces OCA-DGGE ont été réalisées en faisant varier les quantités initiales d'ADN génomique pour chaque espèce. Ainsi les amplifications par PCR ont été réalisées avec les ADN seuls ou mélangés (des 2 espèces) avec des quantités d'ADN allant de 10 à 500 ng. Les produits d'amplification par PCR sont ensuite séparés par

DGGE (Figure 3.2.6) dans les conditions décrites dans le chapitre « Matériels et Méthodes » (cf 2.3.3.).

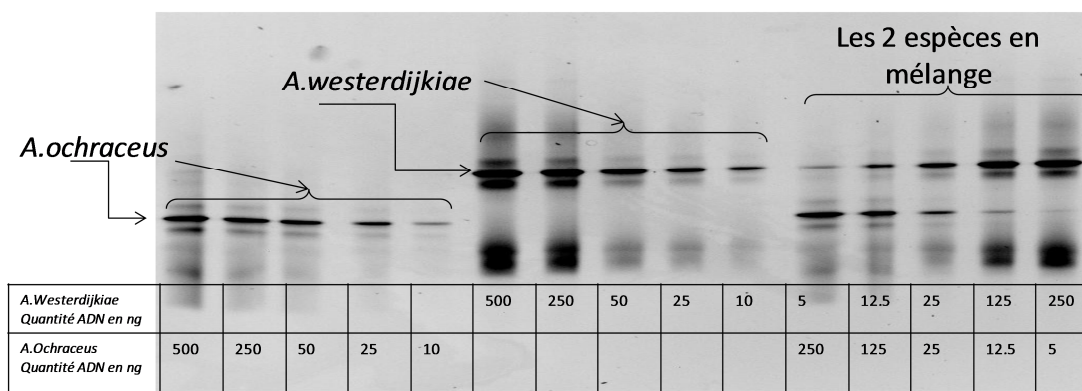


Figure 3.2.6 : Photographie de gel DGGE montrant les amplicons ADNr de souches d'*Aspergillus westerdijkiae* CBS 112.803 et *Aspergillus ochraceus* CBS 108.08 pures et en mélange, à différents niveaux de concentration d'ADN initial.

Grâce au traitement d'image réalisé à l'aide du logiciel Image Quant®, le volume des bandes représentant chaque espèce est mesuré. Ce volume est calculé à partir de la surface de la bande (nombre de pixels qui la composent) multiplié par l'intensité de chaque pixel.

Le volume mesuré est maintenant corrélé avec la quantité d'ADN initialement présente au travers d'une courbe de calibration. Les Figures (3.2.7 et 3.2.8) ont été réalisées avec les valeurs mesurées à partir des bandes de souches pures et à partir des valeurs obtenues avec des souches en mélange.

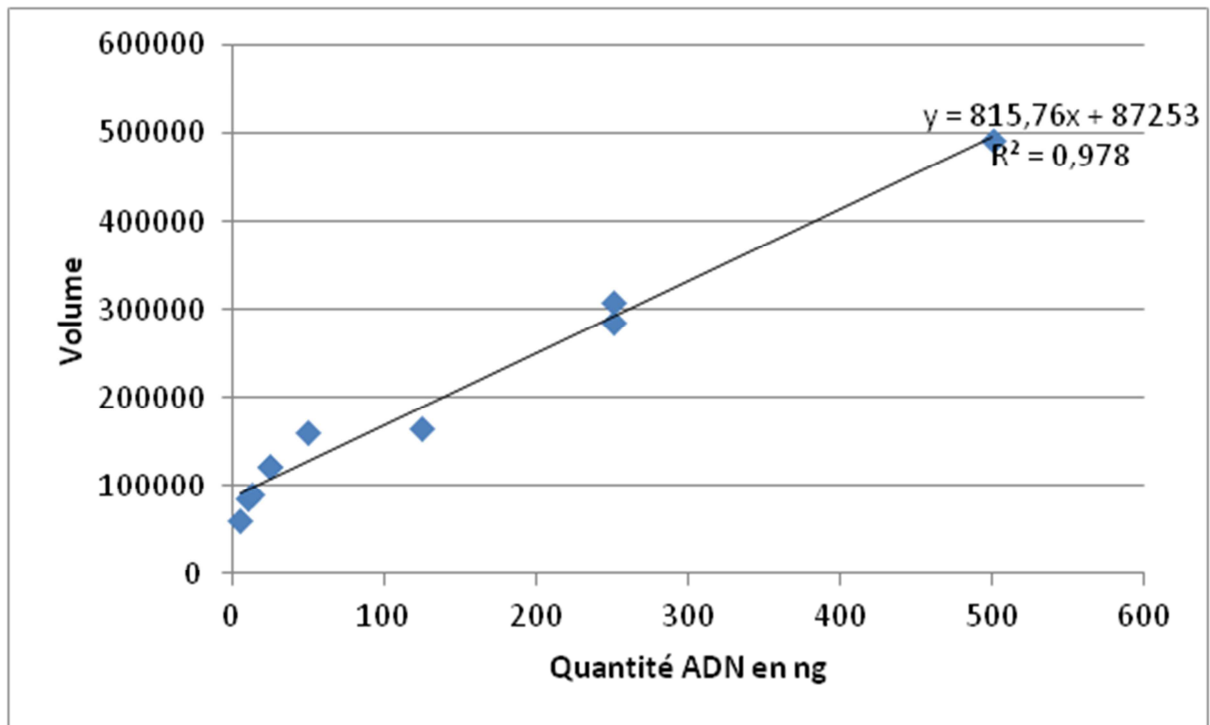


Figure 3.2.7 : Courbe de corrélation entre la quantité en ADN d'*Aspergillus westerdijkiae* et le volume de la bande DGGE

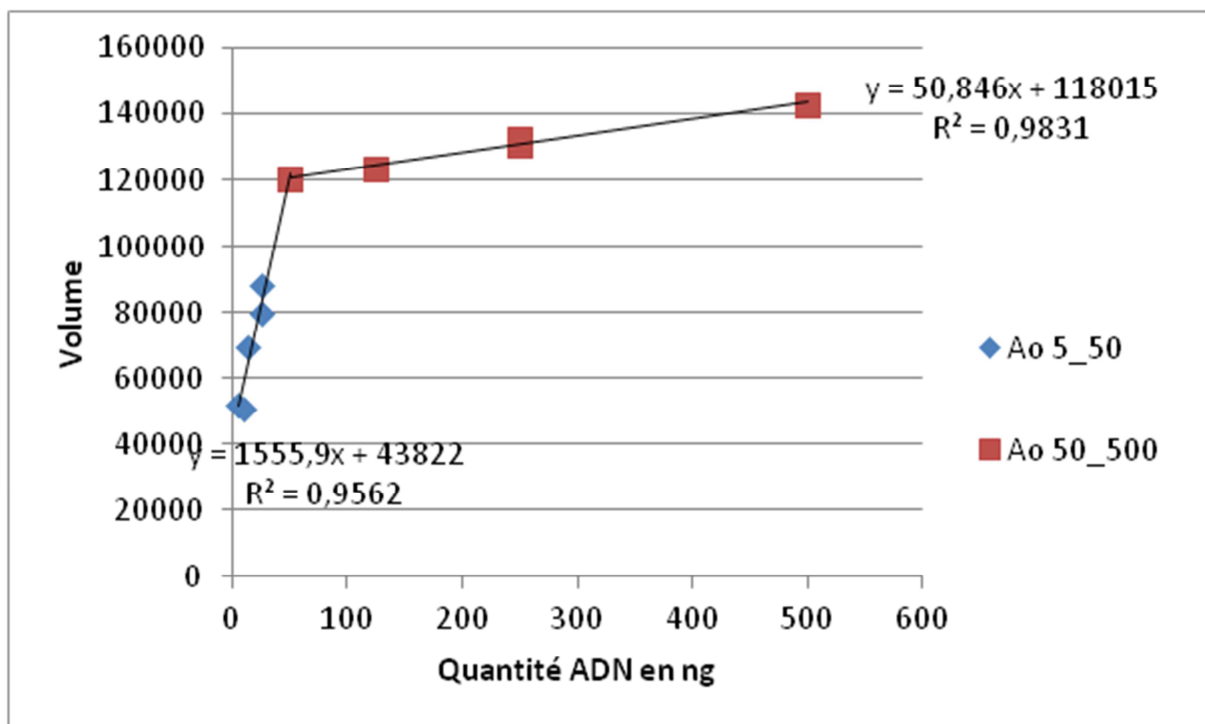


Figure 3.2.8 : Courbes de corrélation entre la quantité en ADN d'*Aspergillus ochraceus* et le volume de la bande DGGE

Quelque soit la souche étudiée nous avons des coefficients de corrélation tout à fait acceptables ($R^2 > 0,95$) pour ce genre d'analyse. Cela nous permet d'envisager d'utiliser cette méthode pour obtenir une comparaison « quantitative » de ces 2 souches dans le cadre d'une co-culture.

3.2.5.2. Répétabilité

Dans les mêmes conditions d'expérience, la répétabilité de la méthode a été testée à partir d'ADN extrait de souches pures d'*Aspergillus westerdijkiae* CBS 112.803 et *Aspergillus ochraceus* CBS 108.08. Ainsi pour chaque espèce, 5 amplifications par PCR (indépendantes) de la même quantité en ADN génomique initial (25 ng pour *Aspergillus ochraceus* et 2.5 ng pour *Aspergillus westerdijkiae*), mais aussi en mélangeant les ADN génomiques des deux espèces (7 amplifications PCR aux mêmes quantités en ADN 12.5 ng pour *Aspergillus ochraceus* et 1.25 ng pour *Aspergillus westerdijkiae*). Les produits d'amplifications par PCR ont ensuite été séparés par DGGE (Figure 3.2.9) dans les conditions décrites dans le chapitre « Matériels et Méthodes » (cf 2.3.3.).

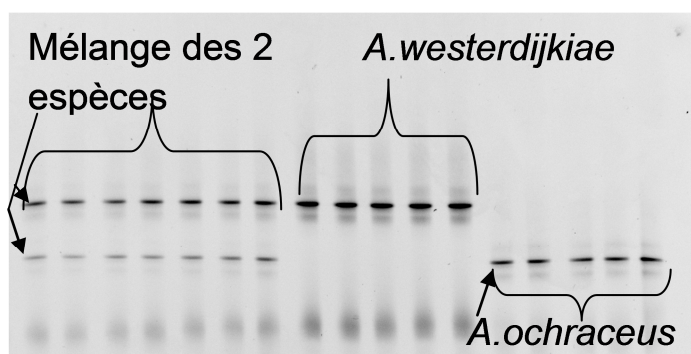


Figure 3.2.9 : Photographie de gel DGGE de souches d'*Aspergillus westerdijkiae* CBS 112.803 et *Aspergillus ochraceus* CBS 108.08 amplifiées par PCR séparément (concentration en ADN : 5 ng/μL pour *Aspergillus ochraceus* et 0.5 ng/μL pour *Aspergillus westerdijkiae*) et en mélange (concentrations en ADN : 2.5 ng/μL pour *Aspergillus ochraceus* et 0.25 ng/μL pour *Aspergillus westerdijkiae*)

Cet essai a été réalisé deux fois et la répétabilité des résultats calculés à l'aide du logiciel Image Quant® a atteint 93.5 et 98% pour la souche *A.westerdijkiae* et 93.2 et 96% pour la souche *A.ochraceus* testées séparément.

Des répétabilités voisines ont été obtenues pour les souches en mélange : 94.3 et 92.3% pour *A.ochraceus*, et de 93.4 et 91.8% *A.westerdijkiae*.

La méthode peut donc permettre de « quantifier » de manière fiable les deux souches testées dans nos conditions d'expériences.

3.2.6. Conclusion

Le travail réalisé dans cette partie de l'étude a permis de mettre au point une méthode simple et rapide de différenciation moléculaire en amplifiant les ADNr avec des amorces communes aux deux espèces de moisissures, puis en utilisant les propriétés de la DGGE pour séparer les amplicons de séquences proches. La méthode a été appliquée avec succès sur des isolats non identifiés de la section Circumdati (7 isolats). Les distances de migrations mesurées sur le gel DGGE et le séquençage des produits d'amplification par PCR, ont permis de confirmer que les souches 1, 3, 4, 5, 6, 7 sont similaires à la souche de référence *A.westerdijkiae* CBS 112.803 et différentes d'*Aspergillus ochraceus* CBS 108.08. De même la différence de migration de la souche 2 par rapport aux autres souches, donc de séquences différentes, a été confirmée par le séquençage.

L'obtention d'une bonne différenciation des espèces couplée à l'analyse d'image des gels DGGE réalisés avec différentes quantités initiales en ADN a également permis d'établir une méthode de « quantification » des deux souches.

Ces différents outils moléculaires présentent un intérêt certain pour la suite de l'étude dans la mesure où ils permettent de suivre différenciellement *Aspergillus westerdijkiae* et *Aspergillus ochraceus* lors de co-cultures et ainsi d'en suivre les éventuelles relations de compétition/inhibition.

3.3. Etude des phénomènes d'inhibition-compétition interspécifiques entre souches ochratoxinogènes

L'utilisation de la biocompétition entre des souches non ou peu toxigènes et des souches toxigènes est une stratégie pour prévenir la présence d'OTA dans le café. Les exemples relevés dans la littérature portent essentiellement sur des compétitions entre levures ou bactéries et moisissures ochratoxinogènes.

Dans les exemples concernant les études entre moisissures, il s'agit notamment de souches d'*Aspergillus niger* aggregate non productrices ou de *Penicillium* dont la présence inhibe l'accumulation d'OTA pendant le séchage du raisin (Valero *et al.*, 2007). Le contrôle biologique par *Trichoderma spp* s'est montré une méthode efficace pour prévenir la pourriture de la grappe qui favorise la contamination par d'autres moisissures qui peuvent être toxigènes (Elad, 1994; Harman *et al.*, 1996; Harman *et al.*, 2004). La réduction de la production d'OTA peut être obtenue par une inhibition de la croissance et/ou de la production de la toxine ou par une décontamination due à une consommation de la toxine après sa production par une autre souche. Dans ce cas, la principale voie de biodégradation est la transformation de l'OTA en OT α et phénylalanine non toxiques pour les microorganismes. Bien que l'OT α soit à priori considérée comme non toxique (tests sur cellules HeLa) (Xiao *et al.*, 1996 ; Wu *et al.*, 2011), il a toutefois été reporté qu'elle pouvait induire des échanges de chromatides à haute concentration chez le porc (Follmann *et al.*, 1995). Les enzymes impliqués qui ont pu être identifiés sont des carboxypeptidases, lipases, protéases ou métalloprotéases d'*A. niger*, *Phaffia rhodozyma* ou *S. cerevisiae* (Abrunhosa *et al.*, 2006 ; Abrunhosa *et al.*, 2007 ; Péteri *et al.*, 2007). Des exemples font en effet état de ce phénomène avec des moisissures de la section Nigri (Varga *et al.*, 2000 ; Abrunhosa *et al.*, 2002). C'est dans ce cadre qu'ont été entrepris des essais de co-cultures avec des souches issues du café afin de rechercher et étudier d'éventuelles inhibitions et/ou compétitions envers les souches ochratoxinogènes.

3.3.1. Etude de la croissance et de la production d'OTA lors de co-cultures d'*A. carbonarius*, *A. niger*, *A. ochraceus* et *A. westerdijkiae*.

La croissance apicale et la production d'OTA ont été étudiées lors de co-cultures 2 à 2 de 4 souches d'*Aspergillus* contaminantes du café: *A. niger* (An) et *A. carbonarius* (Ac) ont été isolés du café provenant de la Finca Jocutla (Veracruz, Mexique) qui utilise un traitement de type voie humide et les souches *A. ochraceus* (Ao) CBS108.08 et *A. westerdijkiae* (Awe) CBS 112803 proviennent du Centraalbureau voor Schimmelcultures (Baarn, Pays Bas).

Les souches ont été testées 2 à 2 sur milieu PDA pH 3.5 : Awe/An, Awe/Ao, Awe/Ac, Ao/An, Ao/Ac, Ac/An. La croissance apicale et la production d'OTA ont été mesurées à J3, J5 et J7 après co-ensemencement central des boîtes de Pétri avec 5 µL de suspensions à 10⁶ spores/mL de chacune des 2 souches. Les valeurs obtenues en co-cultures ont été comparées à celles obtenues pour les souches cultivées individuellement (Figure 3.3.1).

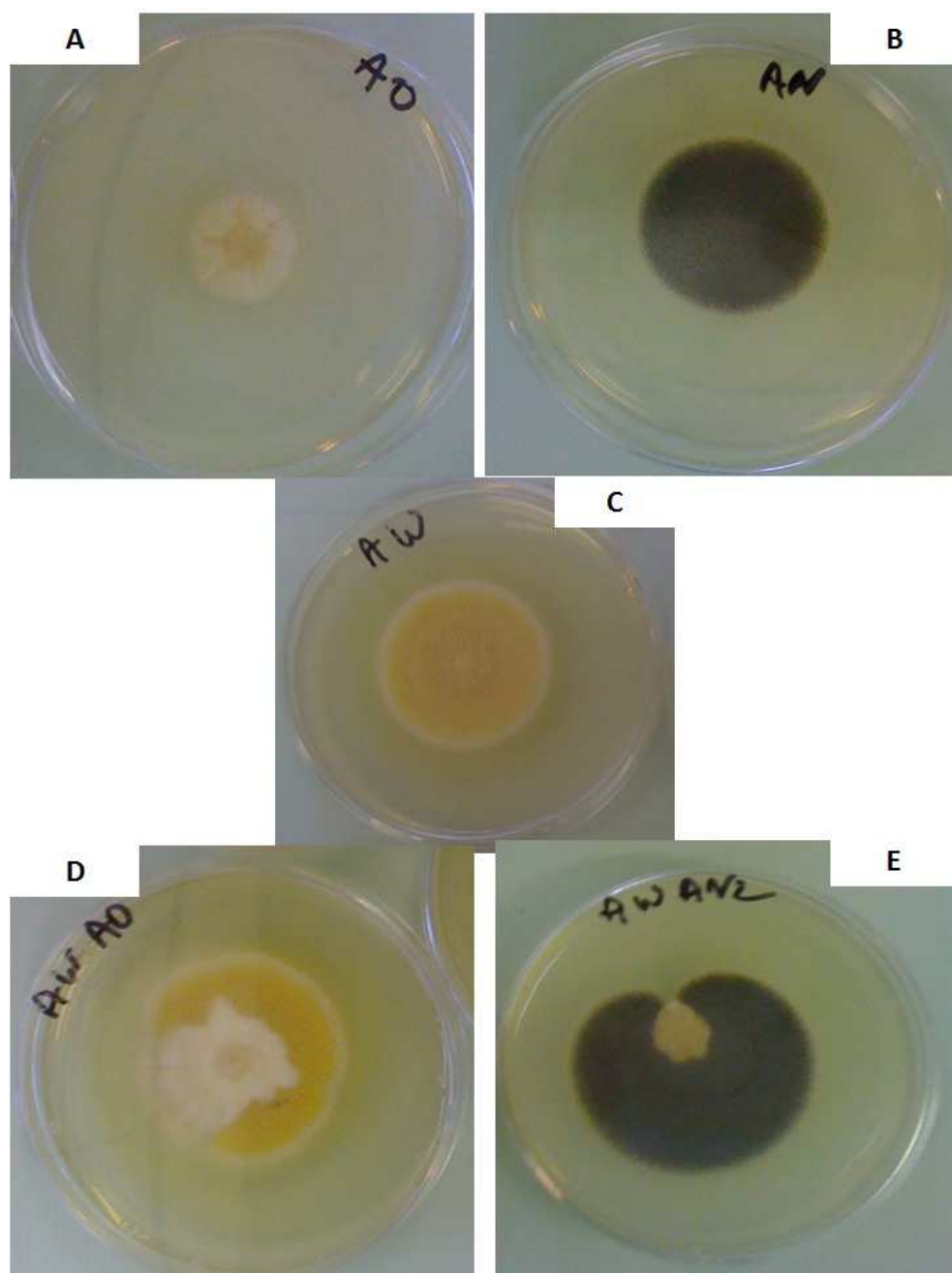


Figure 3.3.1 : Exemple de développement d'*Aspergillus* en culture isolée ou en couple compétiteur avec co-ensemencement central sur milieu PDA: A *Aspergillus ochraceus* ; B *Aspergillus niger* ; C *Aspergillus westerdijkiae* ; D *Aspergillus ochraceus* / *Aspergillus westerdijkiae* ; E *Aspergillus niger* / *Aspergillus westerdijkiae*

Les résultats concernant la croissance sont représentés sur la Figure 3.3.2. Dans le cas de la paire Ao/Awe les valeurs correspondent à la croissance globale du couple car les 2 souches ne sont visuellement pas différenciables.

Les croissances de An et Ac (section Nigri) sont similaires. De même les croissances de Ao et Awe (section Circumdati) sont identiques et inférieures à celles des souches de la section Nigri.

Lorsqu'elles sont cultivées ensemble la croissance des souches de la section Circumdati est inhibée par celle des souches de la section Nigri qui reste inchangée par rapport aux témoins.

La croissance de An est ralentie par la présence de Ac. Il n'est pas observé de différence par rapport aux témoins sur la croissance globale du couple Ao/Awe.

En ce qui concerne la production d'OTA (Figure 3.3.3), il apparaît que seuls Ac (4099 ppb à 7 jours) et surtout Awe (27210 ppb à 7 jours) produisent notablement la toxine.

La production de Ac n'est influencée ni par la présence de An ni par celle de Ao.

Par contre la production du couple Ac/Awe est limitée à une valeur proche de celle de Ac seul (4516 ppb à 7 jours). Compte-tenu de l'inhibition de la croissance de Awe observée en présence Ac il est probable que l'OTA mesurée soit majoritairement produite par cette dernière souche.

La production d'OTA par Awe est fortement influencée par la présence de Ao et An. Celle-ci est en effet totalement inhibée par la présence de An qui inhibe également la croissance de Ao. Dans le cas du couple Ao/Awe la production d'OTA ne représente que 3% de la celle observée lorsque Awe est cultivé seul.

L'analyse de ces résultats nous a conduit à restreindre la suite de cette étude aux couples Awe/Ao et Awe/An qui sont ceux pour lesquels l'interaction des compétiteurs est la plus intéressante en termes de réduction de la production d'OTA, les souches d'An et d'Ao n'étant pas ou très peu productrices d'OTA (Figure 3.3.3), leur utilisation en tant qu'antagonistes s'avère d'autant plus intéressante.

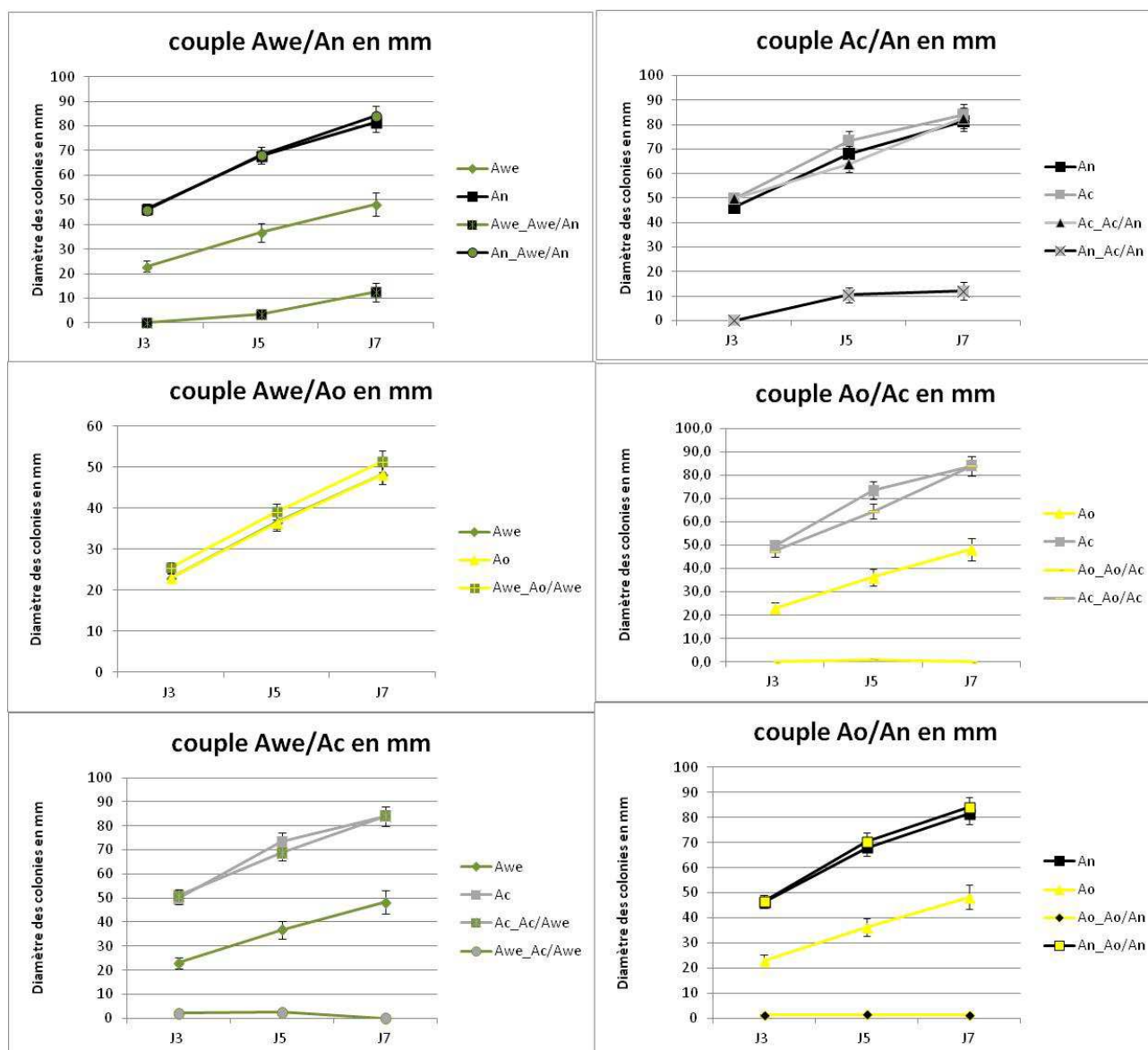


Figure 3.3.2 : Croissance apicale à 3 (J3), 5 (J5) et 7 (J7) jours après co-ensemencement central sur milieu PDA pH 3.5 des couples *Aspergillus westerdijkiae*/*Aspergillus niger* (Awe/An), *Aspergillus westerdijkiae*/*Aspergillus ochraceus* (Awe/Ao), *Aspergillus westerdijkiae*/*Aspergillus carbonarius* (Awe/Ac), *Aspergillus ochraceus*/*Aspergillus niger* (Ao/An), *Aspergillus ochraceus*/*Aspergillus carbonarius* (Ao/Ac), *Aspergillus carbonarius*/*Aspergillus niger* (Ac/An) (5 μ L de suspensions à 10^6 spores/mL de chacune des 2 souches).

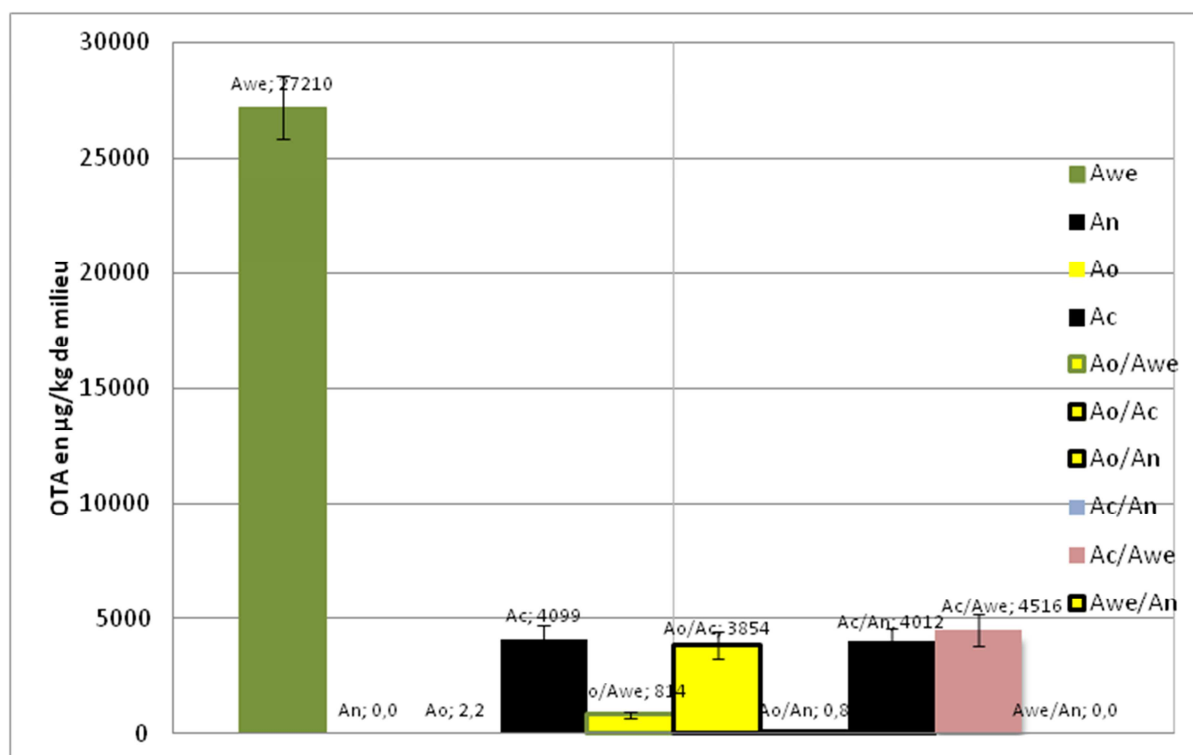


Figure 3.3.3 : Production d'OTA à 7 jours après co-ensemencement central sur milieu PDA pH 3,5 des couples *Aspergillus westerdijkiae*/*Aspergillus niger* (Awe/An), *Aspergillus westerdijkiae*/*Aspergillus ochraceus* (Awe/Ao), *Aspergillus westerdijkiae*/*Aspergillus carbonarius* (Awe/Ac), *Aspergillus ochraceus*/*Aspergillus niger* (Ao/An), *Aspergillus ochraceus*/*Aspergillus carbonarius* (Ao/Ac), *Aspergillus carbonarius*/*Aspergillus niger* (Ac/An) (5 µL de suspensions à 10^6 spores/mL de chacune des 2 souches).

3.3.2. Influence des niveaux d'inoculation des compétiteurs

Afin de définir le seuil à partir duquel apparaît l'inhibition de la croissance et de la production d'OTA, des essais ont été réalisés en faisant varier les niveaux d'inoculation des différents couples compétiteurs (Awe/An et Awe/Ao). La croissance apicale et la production d'OTA ont été mesurées à J3, J5 et J7 après co-ensemencement central des boîtes de Pétri (milieu PDA pH 3,5) avec 5 µL d'une suspension à 10^6 spores/mL de Awe et 5 µL d'une suspension à 10^6 ou 10^4 ou 10^2 spores/mL de An ou Ao. Les valeurs obtenues en co-cultures ont été comparées à celles obtenues pour les souches cultivées individuellement.

3.3.2.1. Couple compétiteur *Aspergillus westerdijkiae*/ *Aspergillus niger* (Awe/An)

Quelque soit le niveau d'inoculation de An en présence Awe inoculé à 10^6 spores/mL, la croissance de An est identique au témoin Anensemencé à 10^6 spores/mL (Figure 3.3.4).

La croissance de Awe est fortement inhibée par An dès J3 pour un niveau d'inoculation pour An compris entre 10^2 spores/mL et 10^4 spores/mL (respectivement 44% et 96 % d'inhibition à J3) (Figure 3.3.4). Au cours du temps, les taux d'inhibition obtenus pour les niveaux d'inoculation à 10^6 spores/mL et 10^4 spores/mL ont tendance à diminuer et à rejoindre l'inhibition toujours croissante observée pour le niveau d'inoculation à 10^2 spores/mL à 7 jours. A ce temps d'incubation, la croissance de Awe est inhibée de 68 à 78 % pour tous les niveaux d'inoculation.

En ce qui concerne la production d'OTA, celle-ci est déjà fortement diminuée pour le niveau d'inoculation à 10^2 spores/mL : 11.8 ppb à J5 contre 13800 ppb pour le témoin Awe cultivé seul. Pour les 2 autres niveaux d'inoculation, la production est presque nulle et même An ne produit pas autant que dans le témoin An cultivé seul. Quelque soit le milieu où An est présent, la teneur en OTA est nulle à J7, ce qui évoque une consommation de la toxine par cette souche faiblement productrice même quand elle la produit elle-même (Figure 3.3.5). Varga *et al.* (2000) ont montré que *A. niger* (CBS 120.49) était capable de réduire de 80 % en 2 jours un apport initial de 500 ppm d'OTA en milieu solide, pour le convertir totalement en 5 jours en OT α qui disparaissait ensuite à 7 jours. Dans les travaux de Bejaoui *et al.* (2006), les souches d'*A.niger* se sont montrées les plus efficaces en terme de dégradation de l'OTA parmi toutes les souches de la section Nigri testées en milieu synthétique enrichi en OTA (2 ppm).

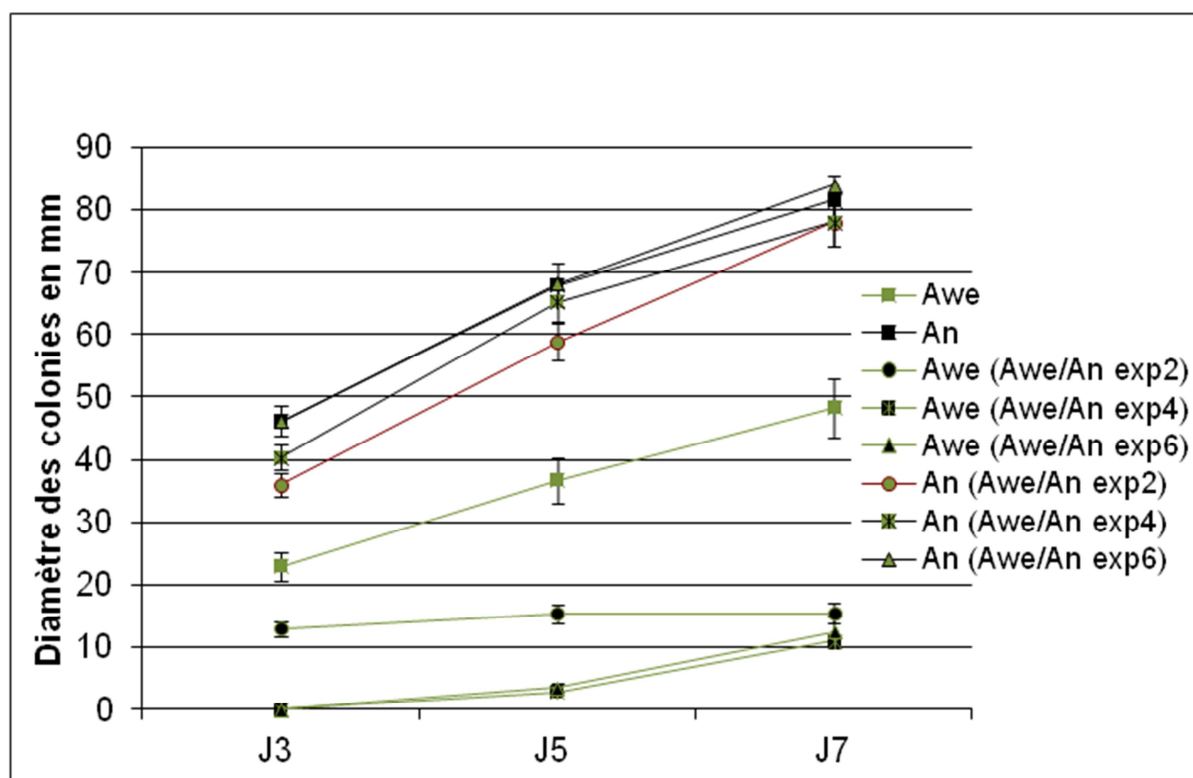


Figure 3.3.4 : Inhibition de la croissance de *Aspergillus westerdijkiae* (Awe) par *Aspergillus niger* (An) après co-ensemencement central sur milieu PDA pH 3,5 pour différents niveaux d'inoculation de *Aspergillus niger* (An) (5 μ L d'une suspension à 10^6 spores/mL de *Aspergillus westerdijkiae* (Awe) et 5 μ L d'une suspension à 10^6 ou 10^4 ou 10^2 spores/mL de *Aspergillus niger* (An))

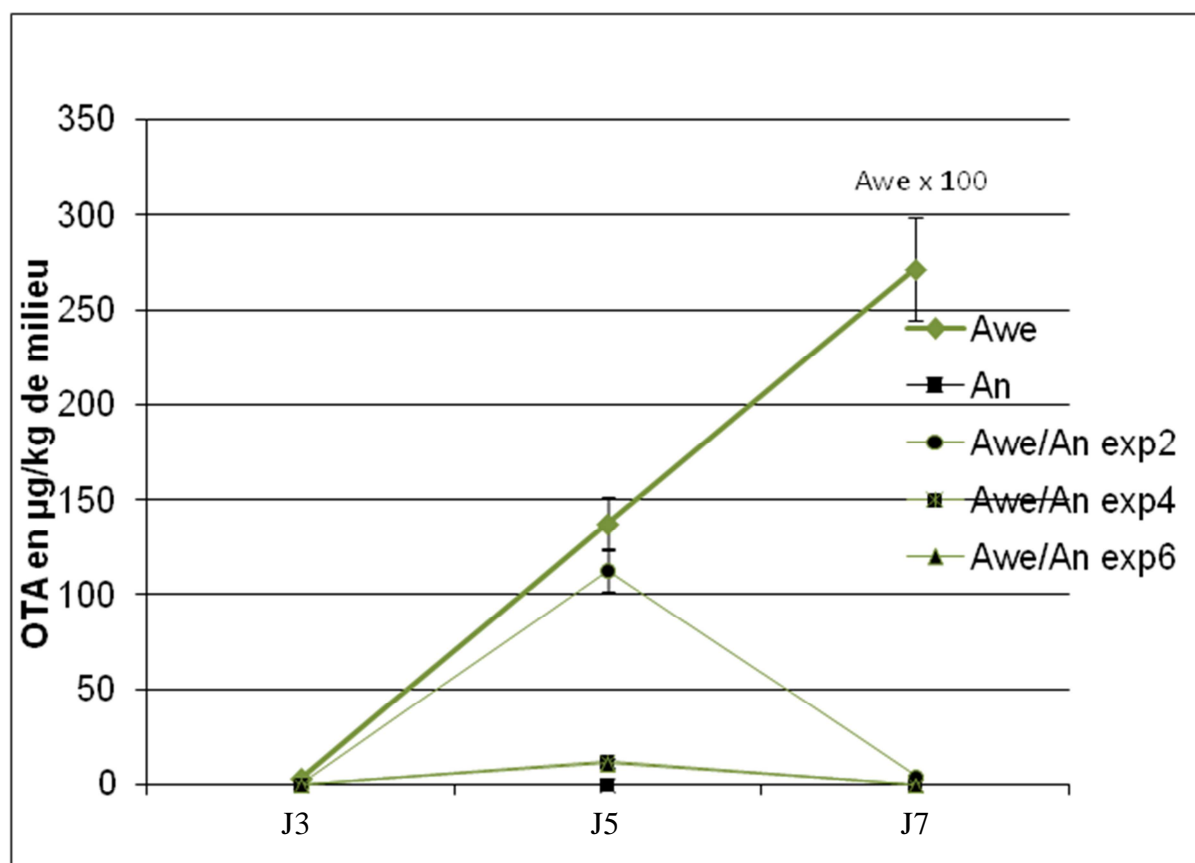


Figure 3.3.5 : Production d'OTA par *Aspergillus westerdijkiae* (Awe) et *Aspergillus niger* (An) après co-ensemencement central sur milieu PDA pH 3,5 pour différents niveaux d'inoculation de *Aspergillus niger* (An) (5 µL d'une suspension à 10^6 spores/mL de *Aspergillus westerdijkiae* (Awe) et 5 µL d'une suspension à 10^6 ou 10^4 ou 10^2 spores/mL de *Aspergillus niger* (An))

3.3.2.2. Couple compétiteur *Aspergillus westerdijkiae*/ *Aspergillus ochraceus* (Awe/Ao).

Des mesures de croissance apicale ont été réalisées à J3, J5 et J7 mais la distinction n'a pu être faite entre les colonies des deux souches en raison de leurs ressemblances phénotypiques. C'est donc le diamètre global qui a été mesuré et représenté sur la Figure 3.3.6. Les couples Awe/Ao ont une croissance identique à celle des souches cultivées seules mais il est impossible de déterminer visuellement la croissance de l'une et de l'autre.

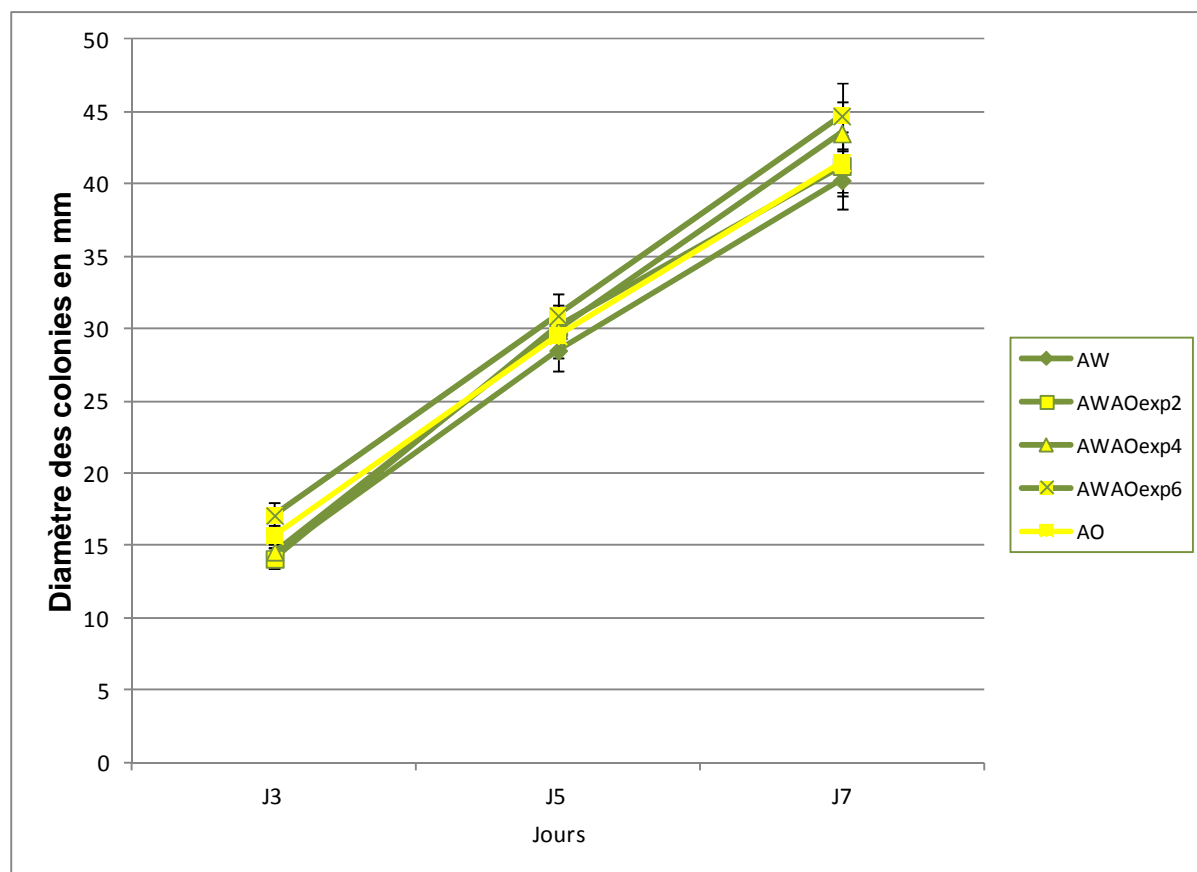


Figure 3.3.6 : Croissance apicale à 3 (J3), 5 (J5) et 7 (J7) jours après co-ensemencement central sur milieu PDA pH 3.5 de *Aspergillus westerdijkiae* (Awe) par *Aspergillus ochraceus* (Ao) après co-ensemencement central sur milieu PDA pH 3,5 pour différents niveaux d'inoculation de *Aspergillus ochraceus* (Ao) (5 μ L d'une suspension à 10^6 spores/mL de *Aspergillus westerdijkiae* (Awe) et 5 μ L d'une suspension à 10^6 ou 10^4 ou 10^2 spores/mL de *Aspergillus ochraceus* (Ao))

Dans cette étude, nous avons donc utilisé la méthodologie mise au point dans le chapitre précédent (Chapitre 4) dans l'optique d'accéder à une « quantification » différentielle des deux souches *Aspergillus westerdijkiae* et *Aspergillus ochraceus*, qui sont visuellement indiscernables. Le but était, après séparation par DGGE et grâce à l'analyse d'image des gels, de déterminer un pourcentage d'inhibition de croissance calculé à partir d'un témoin *Aspergillus westerdijkiae* traité dans les mêmes conditions (extraction, amplification, DGGE, analyse d'image). L'extraction d'ADN a été réalisée sur l'ensemble de la colonie pour toutes les modalités et prélèvements, ce qui permet de suivre l'évolution de la croissance des deux souches au cours de l'expérience.

L'observation du gel DGGE (Figure 3.3.7) nous permet de visualiser les différences d'intensité des bandes d'*A.westerdijkiae*, seul ou en co-cultures avec *A.ochraceus* inoculé à différents niveaux de concentration en spores. Le niveau d'inoculation en spores d'*A.ochraceus*, semble avoir une influence sur le développement d'*A.westerdijkiae* (intensité dégressive des bandes avec le taux croissant d'inoculation en Ao).

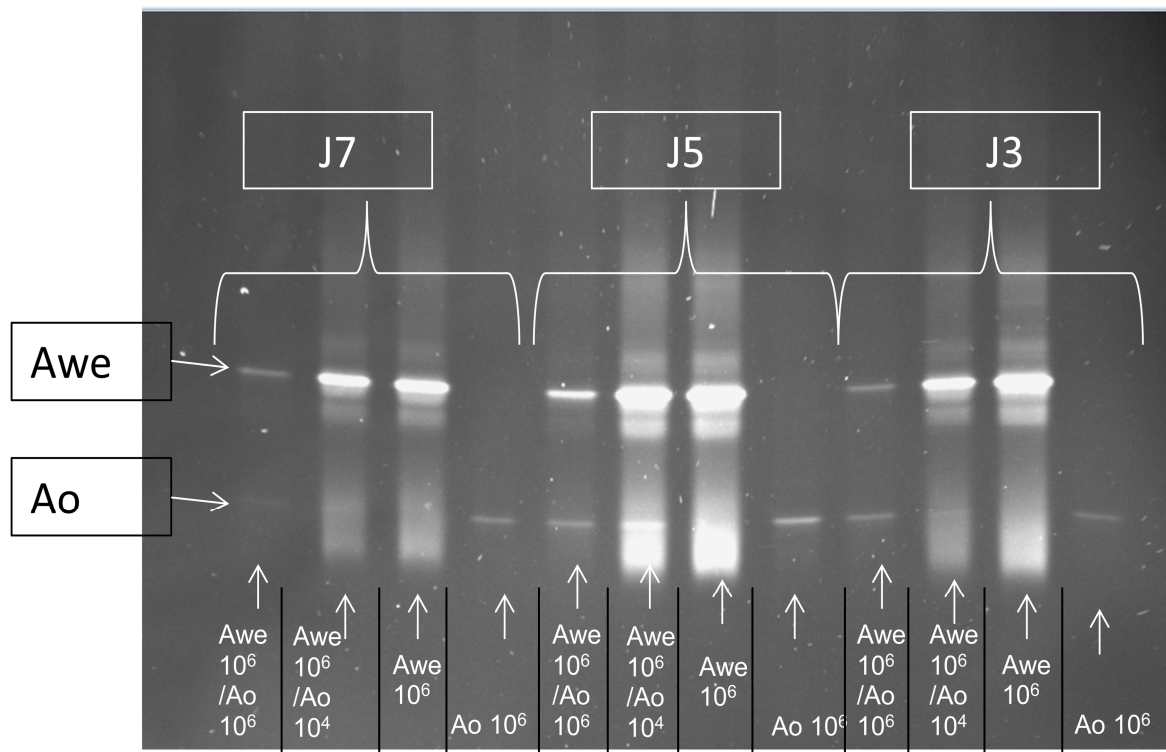


Figure 3.3.7 : Gel DGGE représentant à des jours différents (3,5 et 7 jours) la croissance d'*A.westerdijkiae* seul et en co-culture avec *A.ochraceus* à différents niveaux d'inoculation de Ao (5 μ L d'une suspension à 10^6 spores/mL de Awe et 5 μ L d'une suspension à 10^6 ou 10^4 de Ao)

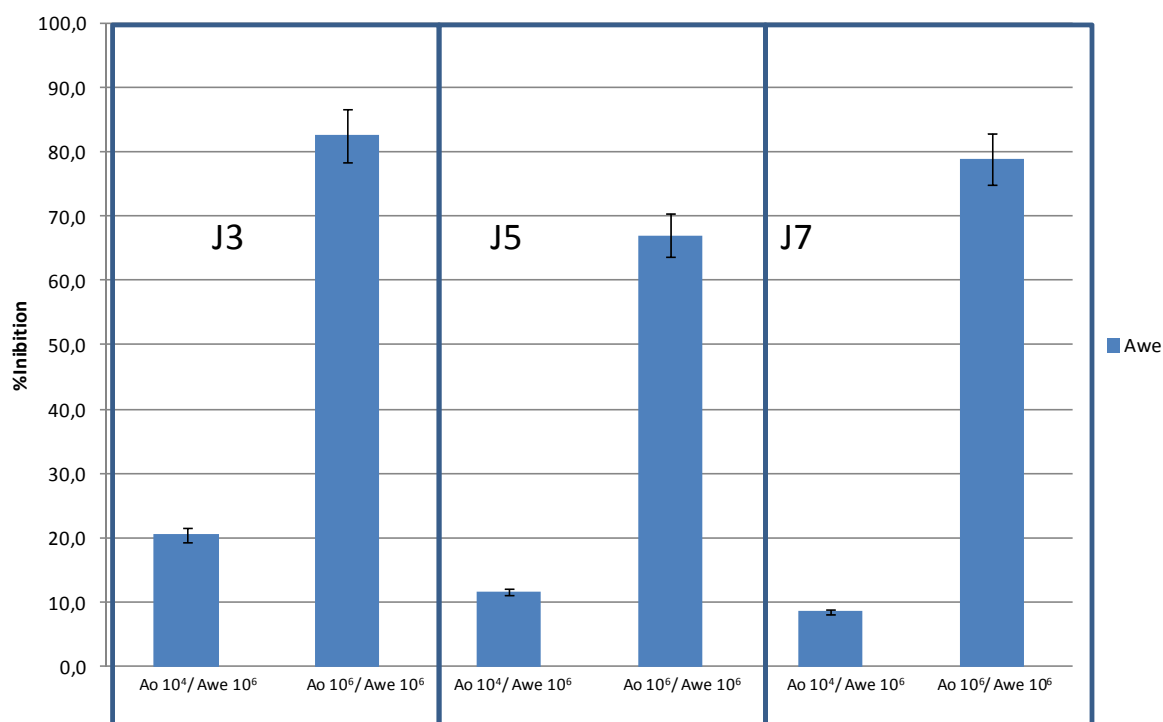


Figure 3.3.8 : Inhibition de la croissance de *Aspergillus westerdijkiae* (Awe) par *Aspergillus ochraceus* (Ao) après co-ensemencement central sur milieu PDA pH 3,5 pour différents niveaux d'inoculation de *Aspergillus ochraceus* (Ao) (5 μ L d'une suspension à 10⁶ spores/mL de Awe et 5 μ L d'une suspension à 10⁶ ou 10⁴ de Ao)

La Figure 3.3.8 a été réalisée en utilisant les valeurs d'intensité de bandes obtenues par analyse d'image du gel DGGE. Le pourcentage d'inhibition de la croissance de Awe en co-culture avec Ao est calculé par rapport au témoin Awe cultivé seul. Quel que soit le niveau d'inoculation de Ao une limitation de la croissance de Awe est observée. Toutefois l'effet est nettement plus marqué pour une inoculation en Ao de 10⁶ spores/mL. Dans ce cas l'inhibition est en moyenne de 75% alors qu'elle est en moyenne de 90% dans les mêmes conditions pour le couple Awe/An. Pour une inoculation en Ao de 10⁴ spores/mL il semble que l'inhibition diminue en fonction du temps puisque celle-ci passe de 20 à 8% en 4 jours.

La production d'OTA (Figure 3.3.9) par Awe est également inhibée par Ao quelque soit le niveau d'inoculation avec cette dernière souche. La réduction de la production est toutefois beaucoup moins importante qu'avec An : la production en OTA à J7 est de 39 % inférieure, pour les niveaux d'inoculation à 10² spores/mL et 10⁴ spores/mL. Seul le niveau d'inoculation à 10⁶ spores/mL permet une réduction de 100%. Comme

il a été observé pour la croissance de Awe pour une inoculation en Ao de 10^4 spores/mL, il semble que l'inhibition de la production d'OTA diminue elle aussi en fonction du temps puisqu'elle passe de 85% à 60% entre J5 et J7. Dans ce cas, il n'est pas observé de disparition de l'OTA dans les milieux. Il s'agit donc bien d'une inhibition de la production et non pas d'une consommation après production comme avec *A. niger*. La réduction biologique de la teneur en OTA peut s'effectuer par un processus de décontamination par biodégradation (consommation de la toxine) (Abrunhosa *et al.*, 2010) ou par des mécanismes de compétition entre souches toxigènes et non toxigènes (Amezqueta *et al.*, 2009). Valero *et al.* (2007) ont ainsi montré que la présence de souches fongiques non productrices d'OTA sur le raisin réduisait la teneur finale en OTA des produits. Degola *et al.* (2011) ont également mis en évidence l'efficacité de souches non aflatoxinogènes de *A. flavus* pour réduire la production de la toxine en co-culture avec des souches productrices.

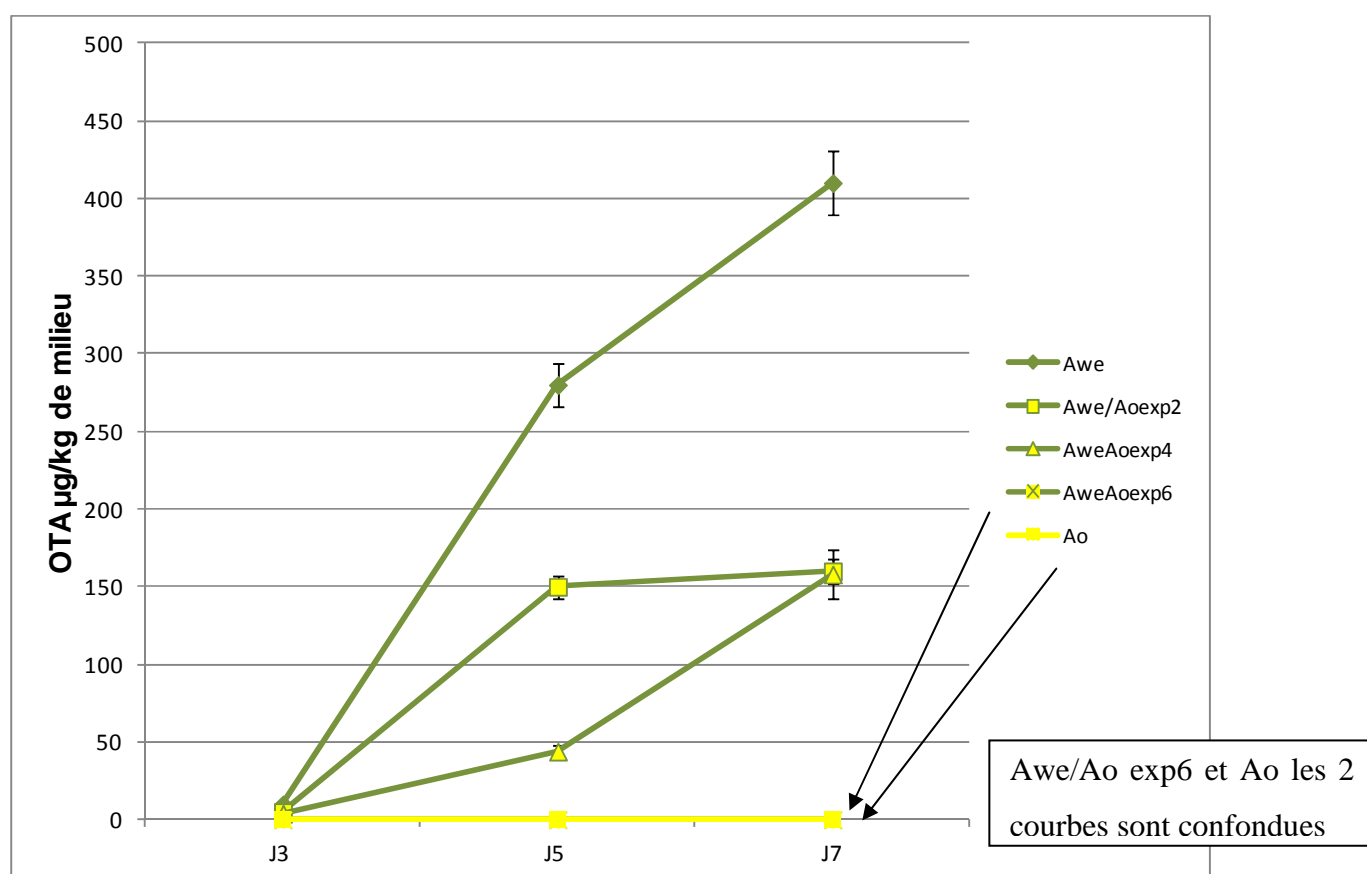


Figure 3.3.9 : Production d'OTA par *Aspergillus westerdijkiae* (Awe) et *Aspergillus ochraceus* (Ao) après co-ensemencement central sur milieu PDA pH 3,5 pour différents niveaux d'inoculation de *Aspergillus ochraceus* (Ao) (5 µL d'une

suspension à 10^6 spores/mL de *Aspergillus westerdijkiae* (Awe) et 5 μ L d'une suspension à 10^6 ou 10^4 ou 10^2 spores/mL de *Aspergillus ochraceus* (Ao))

3.3.3. Etude du mécanisme de compétition

3.3.3.1. Inhibition de contact et/ ou antibiose

Afin de déterminer les mécanismes possibles de l'inhibition de la croissance de Awe et de sa production d'OTA par An et Ao, les 2 souches ont été ensemencées de part et d'autre de la ligne médiane de la boîte de Pétri (PDA pH 3,5) comme cela a été réalisé par Degola *et al.* (2011) avec des souches toxigènes et atoxigènes de *A. flavus*, à raison de 5 μ L d'une suspension à 10^6 spores/mL de chaque souche (Figure 3.3.10). La croissance apicale de chaque souche ainsi que la production d'OTA en différents point de la boîte de Pétri ont été mesurées à J3, J5 et J7 (Figure 3.3.11).

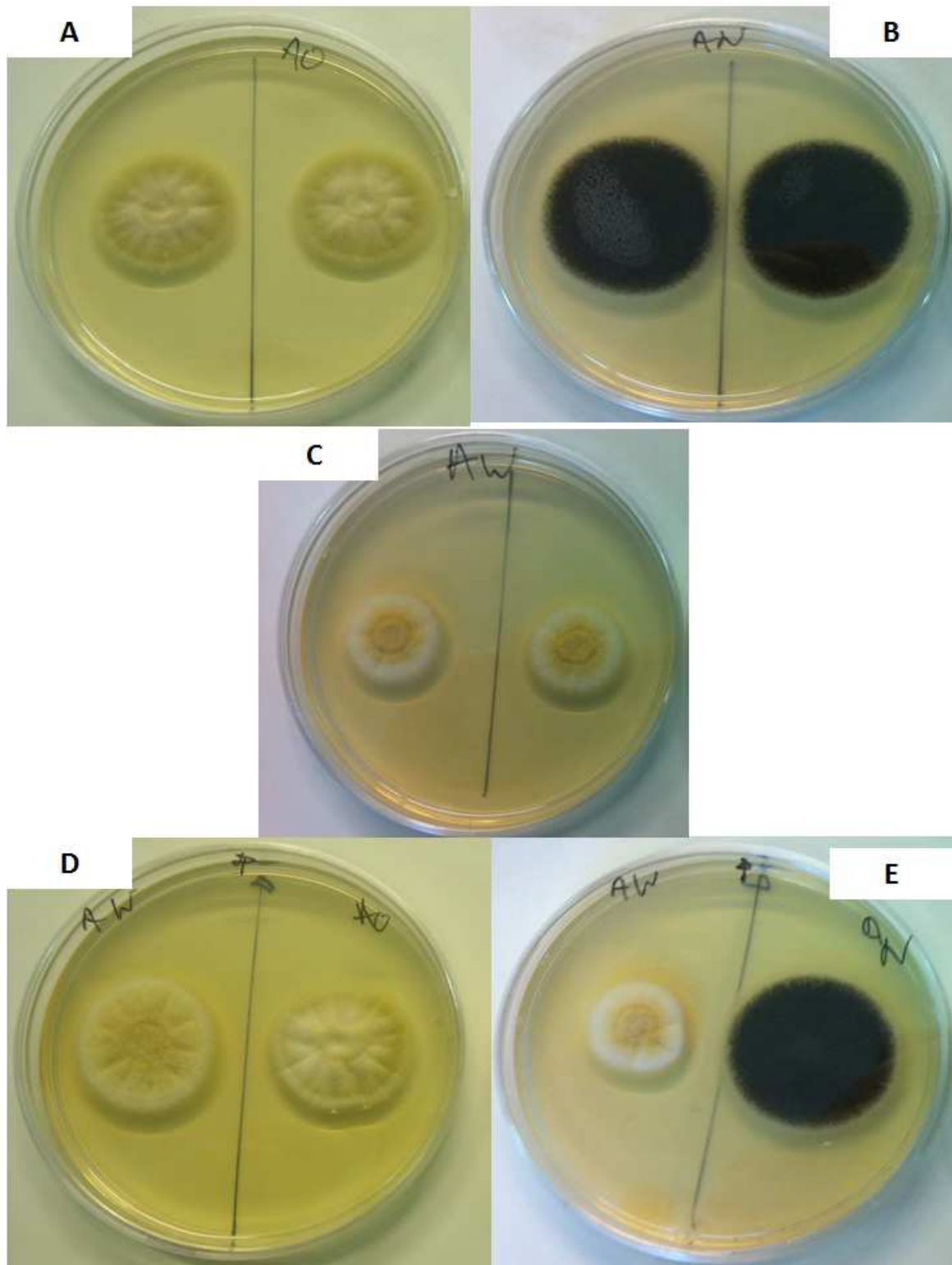


Figure 3.3.10 : Exemple de développement d'*Aspergillus* en culture isolée ou en couple compétiteur avec ensemencement de par et d'autres de la ligne médiane de la boîte de pétri sur milieu PDA: A *Aspergillus ochraceus* ; B *Aspergillus niger* ; C *Aspergillus westerdijkiae* ; D *Aspergillus ochraceus* / *Aspergillus westerdijkiae* ; E *Aspergillus niger* / *Aspergillus westerdijkiae*

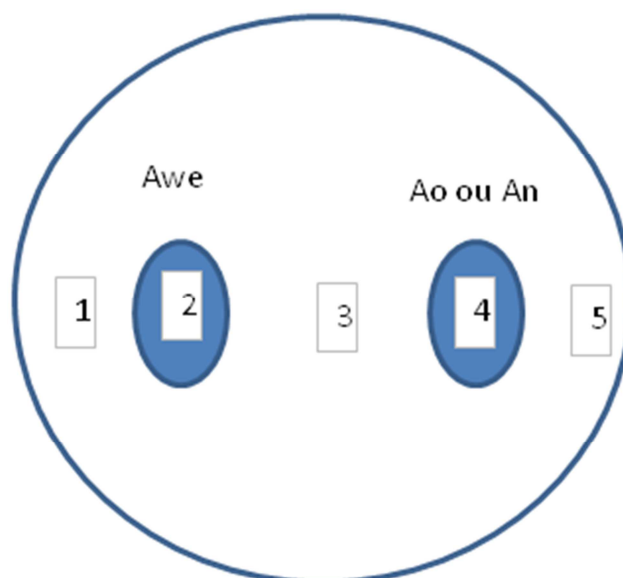


Figure 3.3.11 : Points de prélèvement pour la mesure de la production d'OTA par *Aspergillus westerdijkiae* (Awe) en co-culture avec *Aspergillus niger* (An) ou *Aspergillus ochraceus* (Ao) sur milieu PDA pH 3,5 (1, 2, 3, 4 et 5 : points de prélèvement ; 2 et 4 : spots d'ensemencement des souches)

Les tests de co-cultures espacées ne montrent aucun effet sur les croissances respectives des 2 souches en co-cultures.

La production d'OTA par Awe n'est pas non plus affectée par la présence de An ou Ao dans ce mode de co-culture (Figure 3.3.12). Les teneurs élevées en OTA sont localisées au niveau du spot d'ensemencement de Awe à J3 puis une diffusion progressive de la toxine est observée conjointement à l'augmentation de sa concentration qui atteint entre 10000 et 20000 ppb à J7 en présence de Awe. Il semble donc que des mécanismes d'antibiose, soit par des molécules diffusant dans le milieu, soit par des composés volatils, ne soient pas impliqués.

Lorsque les souches sont co-inoculées en un même point, le principal mécanisme de compétition paraît ainsi être d'ordre nutritionnel entre Awe et Ao dont les vitesses de croissance sont les mêmes sur milieu PDA lorsqu'elles sont cultivées individuellement (7 mm/j en moyenne). Dans le même contexte, l'inhibition de Awe par An est probablement également liée à la vitesse de croissance supérieure de An (environ 12 mm/j en culture individuelle sur PDA contre environ 7 mm/j pour Awe). Lee et Magan (1999) ont mis en évidence d'importantes différences nutritionnelles entre souches d'*Aspergillus*, et notamment une souche ochratoxinogène

d'*A.ochraceus* (possiblement reclassée maintenant en *A. westerdijkiae*), sous l'influence des conditions de culture. L'étude d'Arroyo et *al.* (2008) a montré la domination nutritionnelle de *P. verrucosum* et *A. ochraceus* vis-à-vis de 4 autres souches fongiques et l'influence des facteurs abiotiques.

Ce mode de co-inoculation à distance permet de visualiser la diffusion de la concentration en OTA et ne permet pas à la souche d'*A. niger* de consommer la toxine produite par *A. westerdijkiae* comme dans le cas de co-inoculation ponctuelle et centrale (Figure 3.3.12)

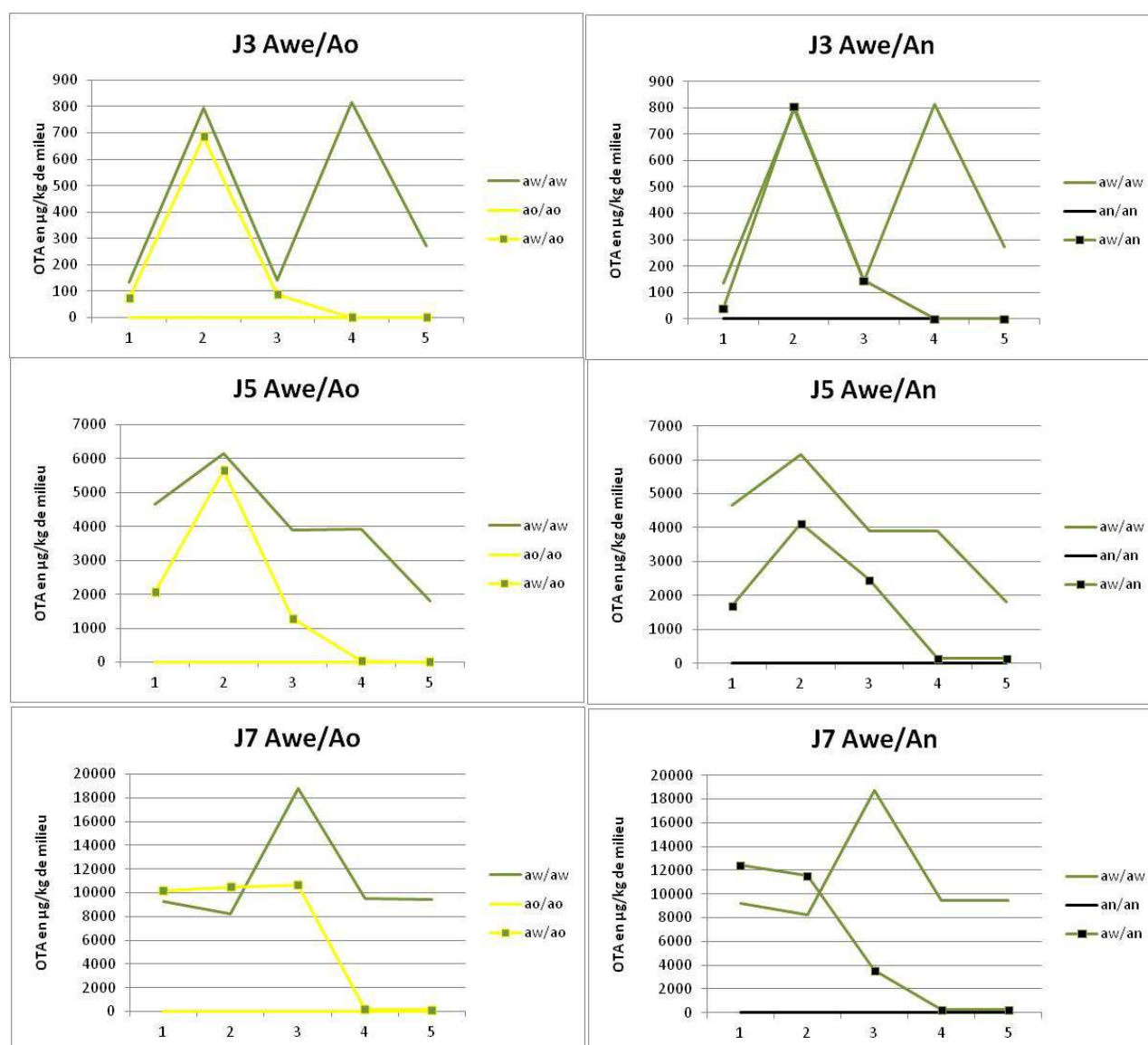


Figure 3.3.12: Teneur en OTA dans le milieu de culture (PDA pH 3,5) en fonction des cinq points de prélèvement dans la boîte de Pétri

3.3.3.2. Influence du milieu de culture

Afin d'étudier l'influence de la composition du milieu de culture sur les mécanismes d'inhibition, des essais ont été réalisés sur milieu « café », matrice naturelle des souches.

Les souches ont été testées 2 à 2 (Awe/An, Awe/Ao) sur milieu « café » et « café + OTA » (voir Matériels et Méthodes cf 2.4.2). La croissance apicale et la production d'OTA ont été mesurées à J3, J5, J7 et J11 après co-ensemencement central des boîtes de Pétri avec 5 μ L de suspensions à 10^6 spores/mL de chacune des 2 souches. Les valeurs obtenues en co-cultures ont été comparées à celles obtenues pour les souches cultivées individuellement (Tableau 3.3.1).

Tableau 3.3.1 : Influence du milieu de culture sur la vitesse de croissance (en mm/j) moyenne à J7 après co-ensemencement central des couples Awe/An, Awe/Ao (5 μ L de suspensions à 10^6 spores/mL de chacune des 2 souches).

Souches	PDA	Café	Café+OTA
Awe	6,9+/-0,14	1,0+/-0,1	2,0+/-0,04
Ao	6,9+/-0,14	1,5+/-0,15	2,1+/-0,04
An	11,6+/-0,23	8,1+/-0,16	7,9+/-0,16
Awe+Ao_Awe/Ao	7,3+/-0,15	1,5+/-0,15	2,3+/-0,23
Awe_Awe/An	1,8+/-0,04	0,0	0,0
An_Awe/An	12,0+/-0,24	8,4+/-0,17	8,3+/-0,17

Comme le montre le Tableau 3.3.1, la vitesse de croissance de toutes les souches est réduite dans les milieux carencés (« café » ou « café + OTA »). L'apport d'OTA semble bénéfique sur milieu café pour la croissance de Awe et Ao qui utilisent probablement la toxine comme substrat mais n'a pas d'effet sur celle de An, ce qui est étonnant compte-tenu de sa capacité de métabolisation déjà mise en évidence dans les cultures sur PDA. Pour le couple compétiteur Awe/An, la croissance de Awe est doublement inhibée par la présence de An et la carence nutritionnelle due au milieu.

3.3.3.2.1. Milieu « café »

Ce milieu est essentiellement constitué de saccharose à raison de 1 g/kg de milieu et de traces de caféine et acides chlorogéniques (0.5 g/kg de milieu au total pour les 2 constituants). La carence nutritionnelle est importante par rapport au milieu PDA et réduit la vitesse de croissance moyenne de 85,5, 78,2 et 30,2 % pour Awe, Ao et An respectivement, par rapport au milieu PDA. C'est Awe qui est le plus affecté en culture individuelle et ce phénomène est amplifié en présence de An. En effet, l'inhibition exercée par An sur la vitesse de croissance de Awe est de 100% sur milieu « café » alors qu'elle n'est que de 74% sur milieu PDA. Parallèlement, An en présence de Awe a la même croissance apicale que An seul, comme sur milieu PDA (Figure 3.3.13).

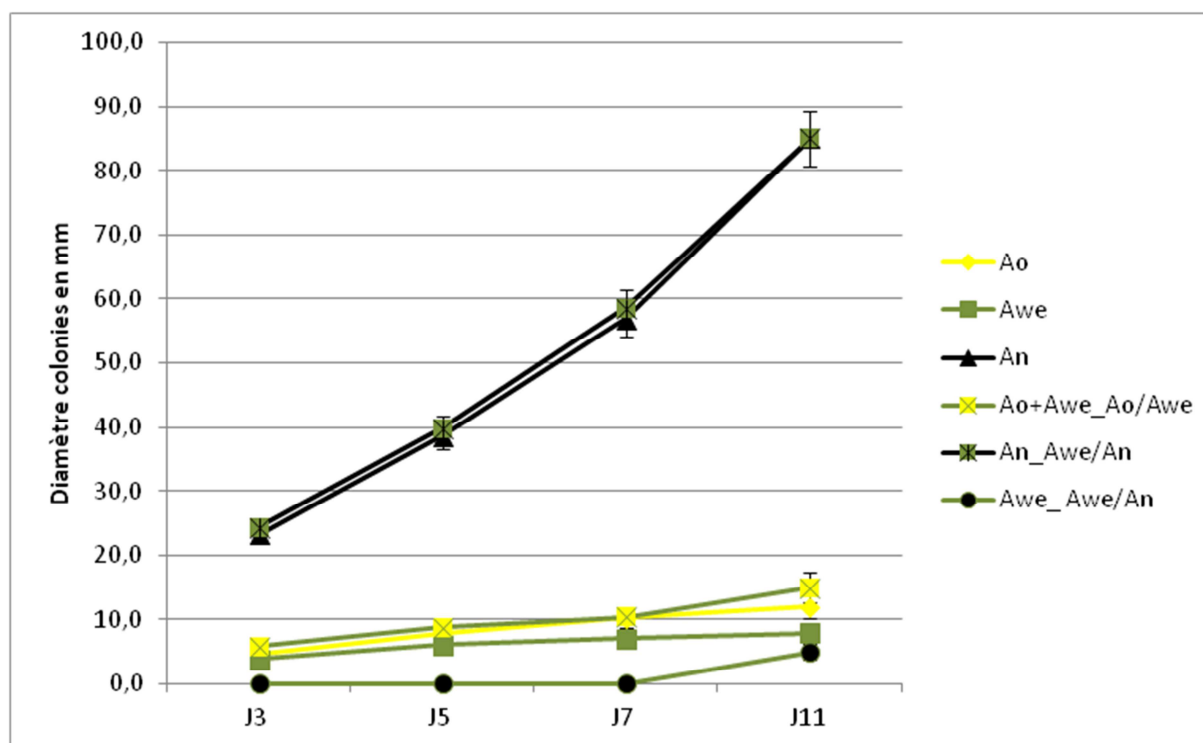


Figure 3.3.13 : Croissance apicale à 3 (J3), 5 (J5), 7 (J7) et 11 (J11) jours après coensemencement central sur milieu « café » des couples *Aspergillus westerdijkiae*/*Aspergillus niger* (Awe/An), *Aspergillus westerdijkiae*/*Aspergillus ochraceus* (Awe/Ao) (5µL de suspensions à 10^6 spores/mL de chacune des 2 souches).

Comme précédemment la croissance de Awe a été étudiée après PCR-DGGE et analyse d'image du gel (Figure 3.3.14). Par rapport au milieu PDA la croissance de

Awe est deux fois moins inhibée par Ao (42% d'inhibition au lieu de 82%) à J3. Cette inhibition constante sur PDA a ici tendance à diminuer avec le temps : elle passe de 42 à 26 % entre J3 et J7. Il faut toutefois noter que cette limitation est mesurée dans des conditions de croissance limitée par les carences du milieu. Il semblerait que la pression exercée par Ao sur Awe diminue en fonction de l'épuisement nutritionnel du milieu.

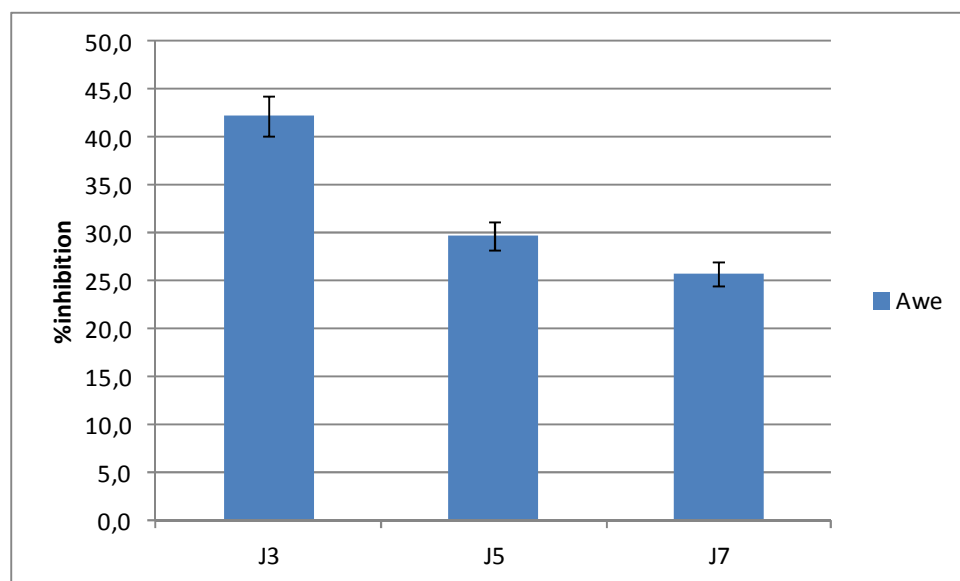


Figure 3.3.14 : Inhibition de la croissance apicale de *Aspergillus westerdijkiae* (Awe) par *Aspergillus ochraceus* (Ao) à 3 (J3), 5 (J5), 7 (J7) jours après co-ensemencement central sur milieu « café » du couple *Aspergillus westerdijkiae*/*Aspergillus ochraceus* (Awe/Ao) (5µL de suspensions à 10^6 spores/mL de chacune des 2 souches).

En ce qui concerne la production d'OTA (Figure 3.3.15), celle-ci est très réduite par rapport à celle observée sur milieu PDA : seulement 9 ppb pour Awe au maximum sur milieu « café » au lieu de 41000 ppb sur milieu PDA. Par ailleurs, quelque soit la souche ou le couple testé, Awe/An ou Awe/Ao (Figure 3.3.15), il y a une production d'OTA dès J3 alors que celle-ci ne se manifeste que plus tard sur milieu PDA (Figure 3.3.6). Par la suite la teneur en OTA des milieux diminue entre J3 et J5 pour se stabiliser entre 1 et 2 ppb.

Ces résultats pourraient être expliqués par une stimulation précoce de la production d'OTA due au stress nutritionnel exercé par le milieu « café » suivie d'une

consommation de la toxine ensuite. De ce fait il est difficile de comparer la croissance de Awe et la teneur en OTA dans le milieu.

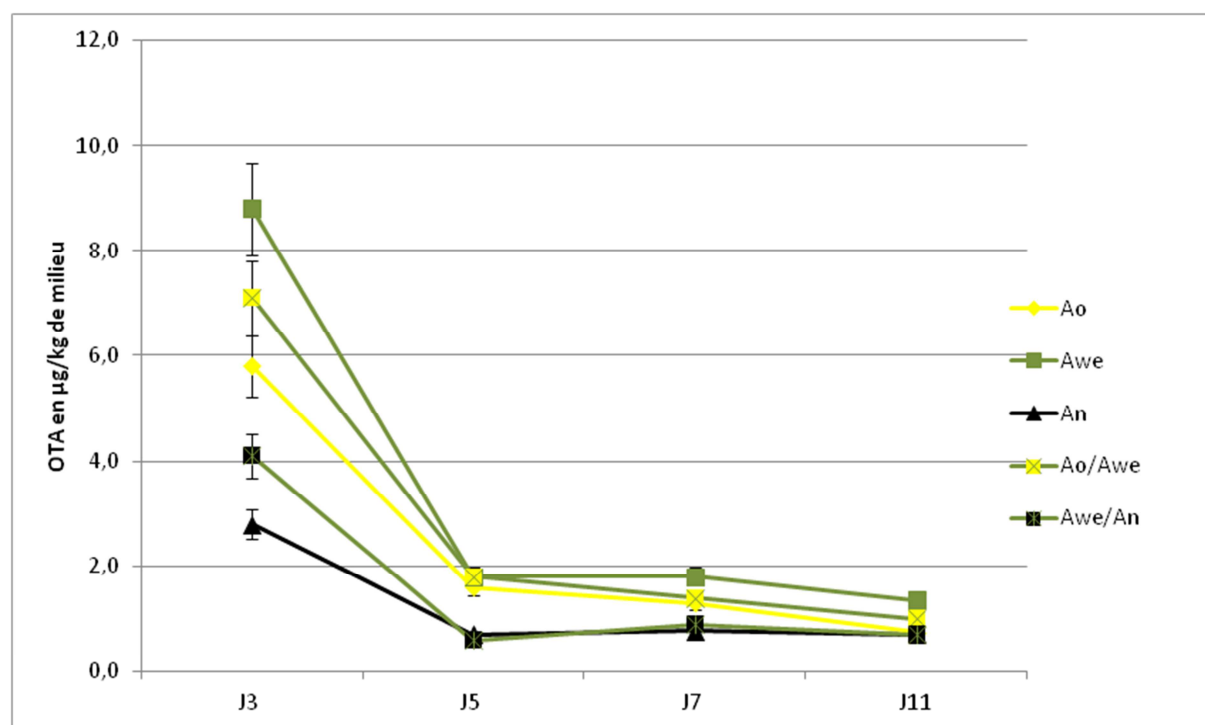


Figure 3.3.15 : Production d'OTA à 3 (J3), 5 (J5), 7 (J7) et 11 (J11) jours après co-ensemencement central sur milieu « café » des couples *Aspergillus westerdijkiae*/*Aspergillus niger* (Awe/An), *Aspergillus westerdijkiae*/*Aspergillus ochraceus* (Awe/Ao) (5µL de suspensions à 10^6 spores/mL de chacune des 2 souches).

3.3.3.2.2. Milieu «café » enrichi en OTA (6 ppb)

Comme précédemment sur milieu « café », la carence nutritionnelle réduit la vitesse de croissance moyenne (Tableau 3.3.1). Toutefois le phénomène est moins marqué pour Awe et Ao car la réduction n'est que de 71,0 et 69,5 % respectivement par rapport au milieu PDA, alors qu'elle reste identique pour An (31.9 %). La présence d'OTA dans le milieu semble réduire les effets de la carence ou compétition nutritionnelle pour les souches de la section Circumdati mais n'influence pas celle de An qui, en présence de Awe à la même croissance apicale que An seul, comme sur milieu PDA (Figure 3.3.16). Il semblerait que An ait une adaptabilité métabolique plus importante que les autres souches, qui lui permet d'assurer sa croissance même en conditions restrictives.

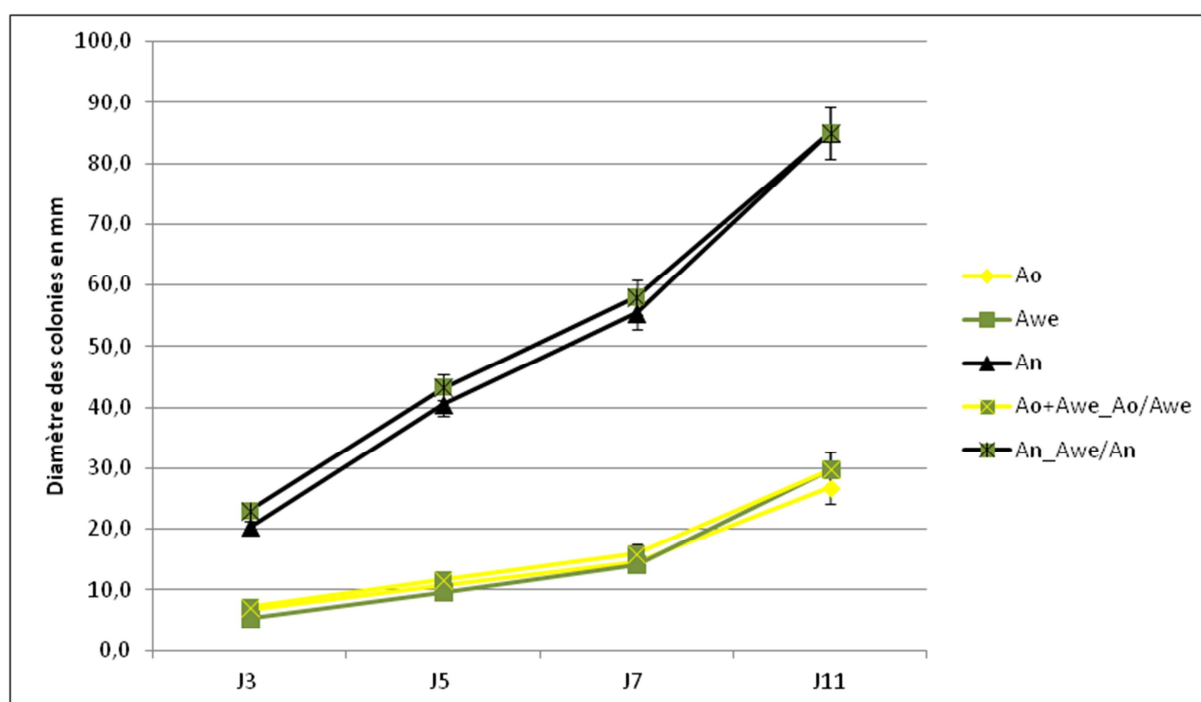


Figure 3.3.16: Croissance apicale à 3 (J3), 5 (J5), 7 (J7) et 11 (J11) jours après co-ensemencement central sur milieu « café + OTA » des couples *Aspergillus westerdijkiae*/*Aspergillus niger* (Awe/An), *Aspergillus westerdijkiae*/*Aspergillus ochraceus* (Awe/Ao) (5µL de suspensions à 10^6 spores/mL de chacune des 2 souches).

Comme précédemment la croissance de Awe a été étudiée après PCR-DGGE et analyse d'image du gel (Figure 3.3.17). L'inhibition de la croissance de Awe est beaucoup plus faible sur milieu « café + OTA » que sur milieu « café » à J3 (10% contre 42%). Cependant l'inhibition augmente de 2.5 fois entre J3 et J5 : il semblerait que la pression exercée par Ao soit décalée dans le temps et peut-être liée à un délai d'assimilation de la toxine qui lui permet de mieux se développer.

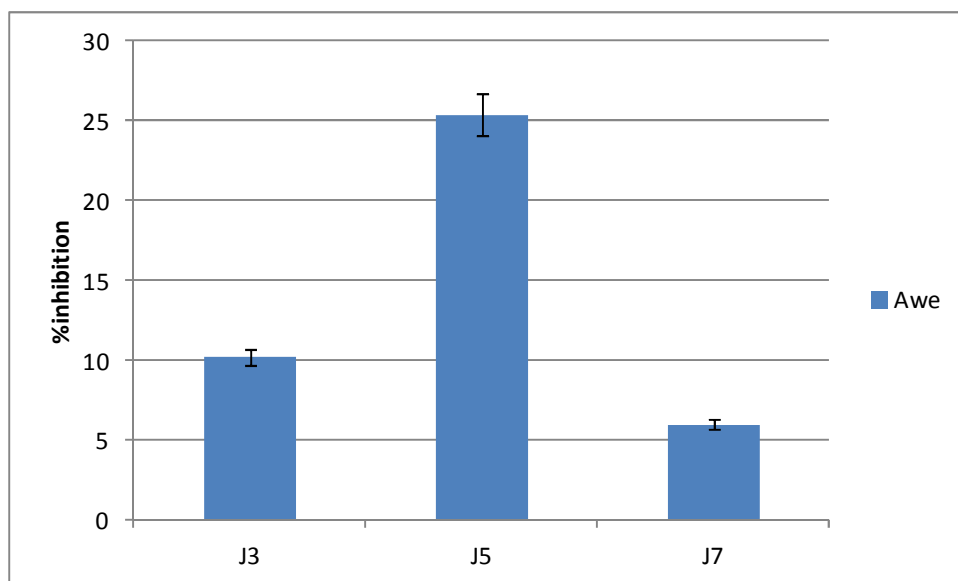


Figure 3.3.17 : Inhibition de la croissance apicale de *Aspergillus westerdijkiae* (Awe) par *Aspergillus ochraceus* (Ao) à 3 (J3), 5 (J5), 7 (J7) jours après co-ensemencement central sur milieu « café + OTA » du couple *Aspergillus westerdijkiae*/*Aspergillus ochraceus* (Awe/Ao) (5µL de suspensions à 10^6 spores/mL de chacune des 2 souches).

La teneur en OTA des milieux (Figure 3.3.18) évolue peu par rapport aux 6 ppb ajoutés initialement. Une faible production est cependant observée en présence de Awe et Ao mais la concentration maximale observée ne dépasse pas 9 ppb. En présence de An la teneur en OTA diminue constamment et est même inférieure au niveau initial dès J3 lorsque An est cultivé seul. La teneur en OTA est également inférieure à 6 ppb à J3 et même J5 lors de la co-culture du couple Awe/Ao : il semblerait que l'une ou l'autre souche, ou les 2, utilisent l'OTA dès la mise en culture. L'augmentation de la teneur en OTA dans le milieu dans le cas du couple Awe/Ao est probablement liée à la faible inhibition de la croissance exercée par Ao sur Awe à J7.

Par ailleurs, quelque soit la souche ou le couple testé, Awe/An ou Awe/Ao, la teneur en OTA des milieux diminue à partir de J7 : la toxine est donc consommée parallèlement ou non à sa production. Bejaoui *et al.* (2006) ont montré que les cinétiques de dégradation de l'OTA dans du jus de raisin synthétique enrichi en OTA à raison de 2 ppm par des souches d'*Aspergillus* de la section Nigri pouvaient être très différentes d'une souche à l'autre. La dégradation de l'OTA commençait

précocement (avant 3 jours) comme dans notre cas puis atteignait 99% à 5 jours avec une souche d'*A. niger*.

La croissance apicale la plus marquée, en l'occurrence celle de An, correspond à la consommation en OTA la plus importante et confirme bien la métabolisation de la toxine par cette souche pour son développement en condition de carence.

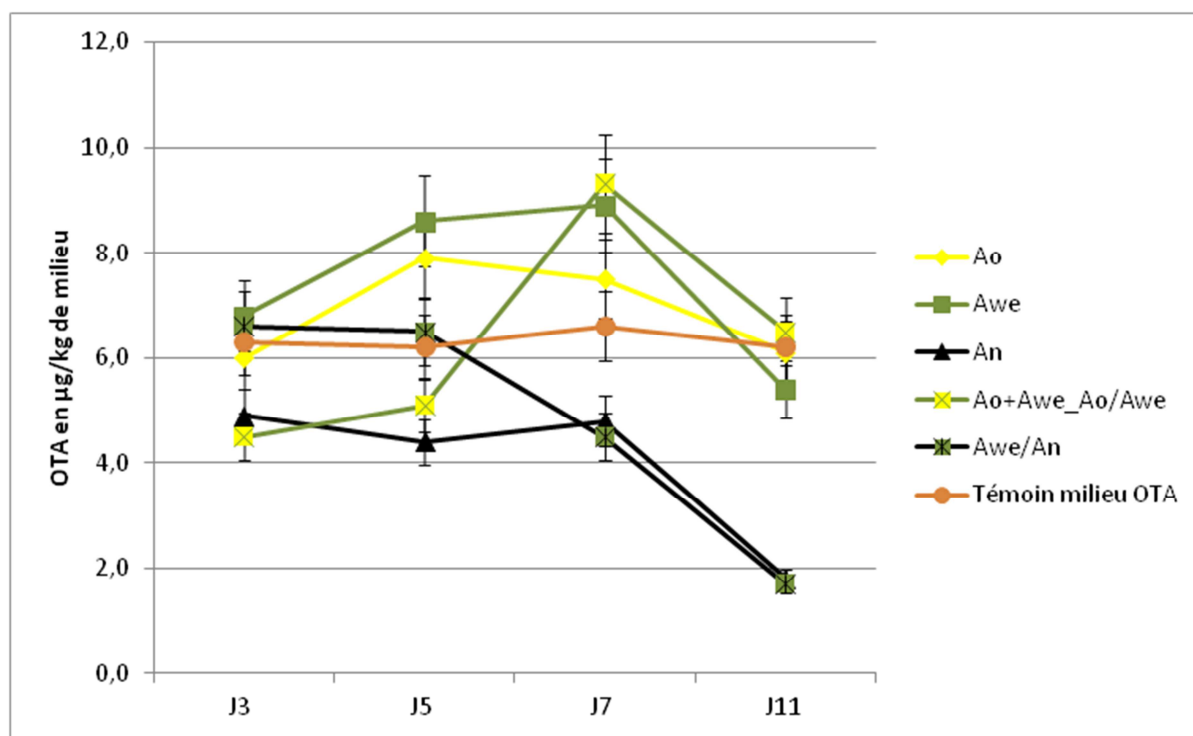


Figure 3.3.18 : Production d'OTA à 3 (J3), 5 (J5), 7 (J7) et 11 (J11) jours après co-ensemencement central sur milieu « café + OTA » des couples *Aspergillus westerdijkiae*/*Aspergillus niger* (Awe/An), *Aspergillus westerdijkiae*/*Aspergillus ochraceus* (Awe/Ao) (5µL de suspensions à 10^6 spores/mL de chacune des 2 souches).

3.3.4. Conclusion

L'objectif principal de cette étude était de mettre en évidence une éventuelle inhibition et/ ou compétition entre souches d'*Aspergillus* ayant des niveaux de production d'OTA très différents : *Aspergillus niger*, *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae* et *A. carbonarius*.

Nous avons testé 2 à 2 tous les couples possibles afin d'identifier les couples cibles/compétiteurs-inhibiteurs les plus intéressants. Nous avons ensuite défini les

seuils de concentration en compétiteur, à partir desquels apparaît l'inhibition de croissance et de la production en OTA. Enfin nous avons tenté d'élucider les mécanismes de compétition-inhibition en recherchant l'existence de mécanismes d'antibiose et en testant l'effet d'une carence nutritionnelle couplée ou non à la présence d'OTA.

Nous avons montré qu'il existe une réelle compétition entre les souches de la section *Circumdati* et celle de la section *Nigri*. Les couples cibles /compétiteurs les plus intéressants en termes de réduction de la production d'OTA sont Awe/Ao et Awe/An.

La présence de An exerce une pression sur Awe plus importante que celle de Ao. Ceci est confirmé par un seuil d'efficacité plus bas pour An : l'action de An sur Awe se manifeste pour un ratio de co-inoculation entre 1/100 et 1/10000 alors que Ao n'est réellement actif qu'à partir d'un ratio de 1/100. L'évolution de la concentration en OTA dans le temps évoque une consommation de celle-ci par An.

Nous n'avons pas mis en évidence de mécanismes d'antibiose par diffusion de molécules actives dans le milieu.

Dans des milieux carencés, comme dans le milieu « café » par exemple, il semblerait que toutes les souches produisent précocement la toxine sous l'influence du stress nutritionnel puis consomment l'OTA afin de pallier le déficit de nutriments. Cette dernière observation est confirmée, lors de l'ajout d'OTA dans le milieu « café ».

Afin de vérifier cette hypothèse nous avons recherché la présence d'OT α dans les différents tests. En effet l'OT α (ou isocoumarine) est un produit de dégradation de l'OTA (Abrunhosa *et al.*, 2006 ; Abrunhosa *et al.*, 2007 ; Péteri *et al.*, 2007). Nous n'avons détecté la présence d'OT α que dans les essais où Ao était présent.

Lors des essais dans les milieux « café », la présence d'OT α et son augmentation dans le milieu coïncide avec la diminution de l'OTA, avec une augmentation brutale à J7 (Figure 3.3.19).

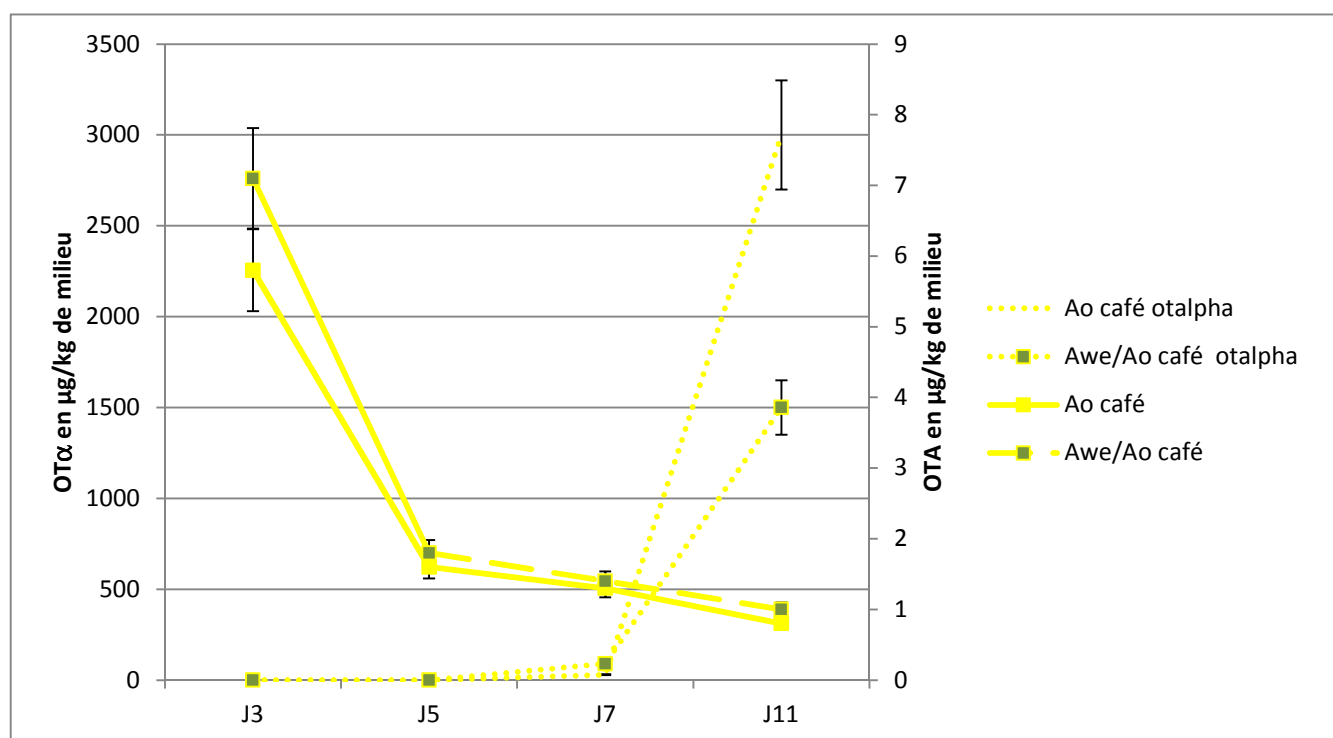


Figure 3.3.19 : Evolution des teneurs en OTA et OTα sur 11 jours après co-ensemencement central sur milieu « café » du couple *Aspergillus westerdijkiae*/*Aspergillus ochraceus* (Awe/Ao) (5µL de suspensions à 10⁶spores/mL de chacune des 2 souches).

Lors des essais dans les milieux « café + OTA », le phénomène est différent. La présence initiale d'OTA dans le milieu engendre une apparition précoce de l'OTα avec une augmentation dès J5 (Figure 3.3.20), coïncidant avec le maximum en OTA. La disparition de l'OTα entre J7 et J11 peut résulter d'une utilisation par Ao dans une seconde phase.

Le profil de concentration en OTα dans le temps se superpose avec un décalage de 2 jours avec celui de l'inhibition exercée par Ao sur Awe. Ce phénomène pourrait être expliqué par le délai d'assimilation de la toxine par Ao.

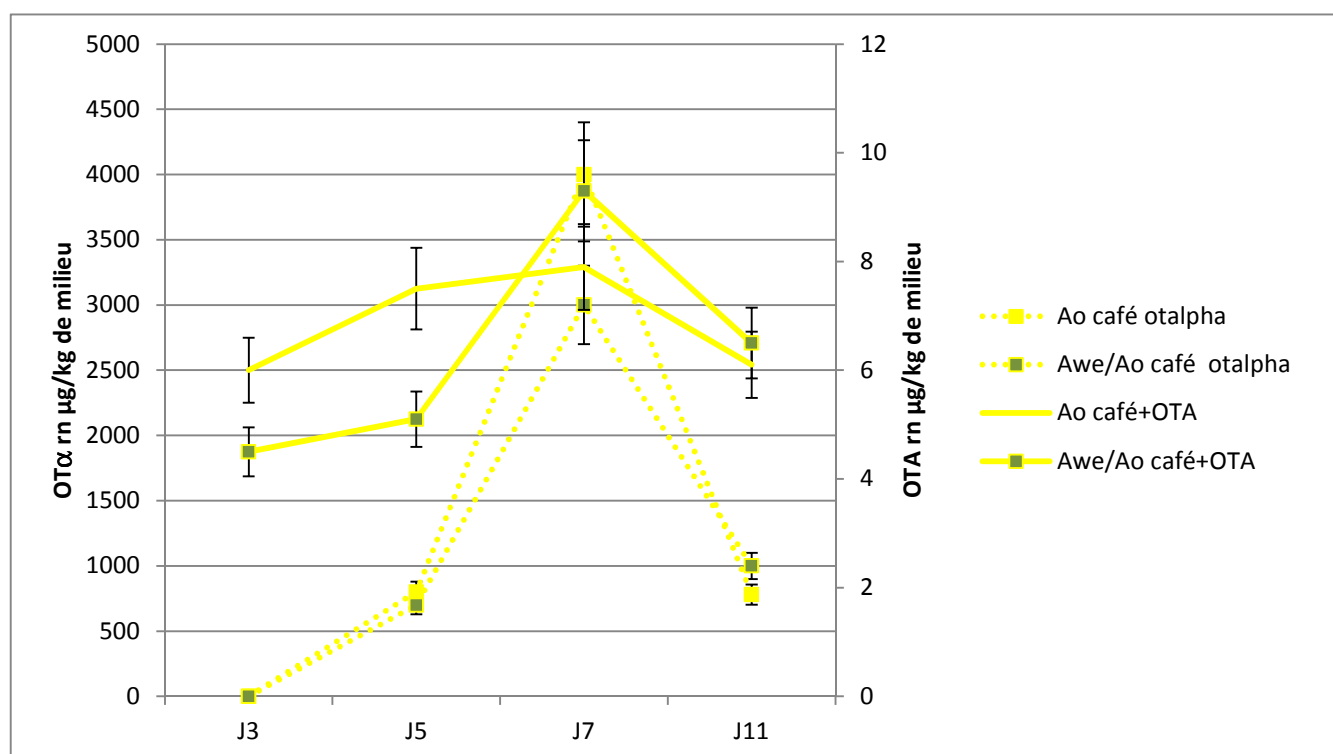


Figure 3.3.20 : Evolution des teneurs en OTA et OTα sur 11 jours après co-ensemencement central sur milieu « café + OTA » du couple *Aspergillus westerdijkiae*/*Aspergillus ochraceus* (Awe/Ao) (5µL de suspensions à 10⁶spores/mL de chacune des 2 souches).

En ce qui concerne le couple Awe/An, la consommation d'OTA pour pallier le déficit en nutriments semble elle aussi probable. Mais aucune trace d'OTα ne permet de le confirmer.

Varga *et al.* (2000) puis Bejaoui *et al.* (2006) ont montré que des souches de la section Nigri, et notamment d'*A. niger*, étaient également capables de dégrader l'OTα en moins de 7 à 9 jours en un composé inconnu.

En conclusion, le phénomène d'inhibition semble être la conjonction de plusieurs mécanismes, une vitesse de croissance plus importante que les autres souches dans le cas de An (Figure 3.3.21) et une demande importante de cette souche en nutriments dont l'OTA.

La consommation d'OTA par *Aspergillus niger* a déjà été démontrée, nous pouvons la confirmer aussi pour *A. ochraceus* et la supposer pour *A. westerdijkiae*. Toutefois les processus métaboliques semblent différents puisque Awe et An paraissent utiliser la molécule en une seule étape alors que Ao procéderait d'abord à une

décomposition de l'OTA en OT α , suivie ultérieurement d'une consommation de celle-ci.

La comparaison des vitesses moyennes de croissance à 7 jours dans les différents milieux montre la forte influence de la composition du milieu sur la croissance et la toxinogénèse. L'ajout d'OTA dans le milieu « café » semble stimuler la croissance de Awe et Ao alors que celle de An n'est pas modifiée par rapport à celle obtenue sur milieu « café » sans OTA (Figure 3.3.21).

Il apparaît que An consomme l'OTA quel que soient les conditions alors que Ao et Awe n'utilisent la toxine qu'en situation de stress nutritionnel. Ce fait est confirmé lorsque les 2 souches sont cultivées ensemble, ce qui augmente les conditions de stress, sur milieu « café + OTA » où elles utilisent la toxine avant les souches cultivées seules.

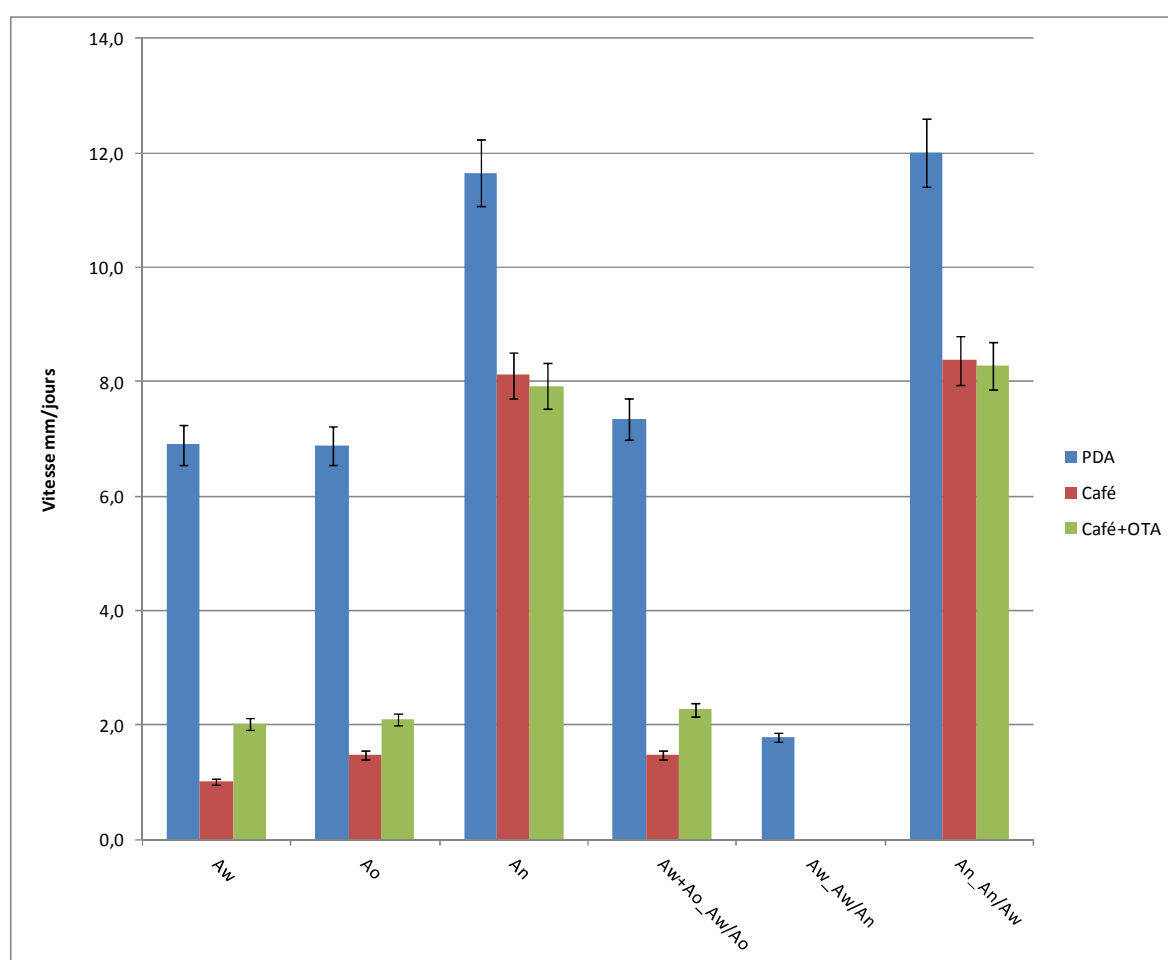


Figure 3.3.21 : Comparaison des vitesses moyennes de croissance à 7 jours dans les milieux PDA, « café » et « café + OTA »

4. CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Ce travail avait pour objectif d'améliorer les connaissances sur la dynamique des populations microbiennes au cours de la transformation post-récolte du café en relation avec la contamination en OTA du café vert et d'étudier les relations interspécifiques entre souches ochratoxinogènes.

Des réponses ont été données aux questions de recherche posées au départ de cette étude :

Cette étude a montré que la PCR- DGGE permettait de suivre qualitativement et quantitativement la biodiversité et la dynamique des populations microbiennes au cours des étapes des différents traitements post-récolte du café. En effet la méthodologie utilisée nous a permis de différencier les différentes étapes des traitements post-récoltes du café en utilisant les profils DGGE obtenus pour chaque type de microorganismes et ce pour trois traitements technologiques différents. Cette même étude nous a permis de différencier trois fincas (fermes) à partir des profils DGGE des microorganismes du café vert. Cette différenciation est sûrement liée à la fois au type de traitement ainsi qu'à la zone géographique.

Les essais d'identification moléculaire par séquençage des souches en utilisant les amplicons séparés par DGGE et en comparant les distances de migration par rapport à des témoins (souches pures) n'ont pas donné de résultats satisfaisants en raison des problèmes de co-migration rencontrés et de la taille trop restreinte du fragment séquencé.

La méthodologie PCR-DGGE, dans les conditions de notre étude, ne nous a pas permis de relier statistiquement le taux d'OTA à un profil DGGE de moisissures. Plusieurs phénomènes peuvent expliquer la difficulté à montrer cette relation comme par exemple la co-migration de certaines espèces d'*Aspergillus* sur le gel DGGE.

. De plus nous savons que la production d'OTA par les souches productrices n'est pas systématique car liée à un métabolisme secondaire et dépend surtout des conditions physiologiques et environnementales dans lesquelles se trouvent les microorganismes. Par ailleurs il existe parmi les espèces ochratoxinogènes des niveaux de production très différents comme c'est le cas pour *A. ochraceus*, *A. westerdijkiae*, *A. niger* et *A. carbonarius* qui se retrouvent sur les échantillons de café.

Le travail réalisé par la suite pour répondre à cette dernière observation, nous a permis de mettre au point une méthode simple et rapide de différenciation

moléculaire d'*Aspergillus westerdijkiae* et d'*Aspergillus ochraceus* en amplifiant les ADNr avec des amorces communes aux deux espèces de moisissures, puis en utilisant les propriétés de la DGGE pour séparer les amplicons de séquences proches. La méthode a été appliquée avec succès sur des isolats non identifiés de la section Circumdati (7 isolats) et les résultats ont été confirmés par le séquençage des amplicons ainsi que par le dosage de la production d'OTA par les souches testées.

L'obtention d'une bonne différenciation des espèces couplée à l'analyse d'image des gels DGGE réalisés avec différentes quantités initiales en ADN a également permis d'établir une nouvelle méthode de « quantification » des deux souches.

Une réelle compétition a été mise en évidence sur milieu PDA entre les différents couples de souches d'*Aspergillus* potentiellement compétiteurs isolés de café et testés pour leur niveau de production d'OTA différents. Les couples cibles/compétiteurs *Aspergillus westerdijkiae*/*Aspergillus ochraceus* et *Aspergillus westerdijkiae*/*Aspergillus niger* ont été les plus intéressants en termes de réduction de la production d'OTA, les souches compétitrices étant très faiblement productrices d'OTA. Afin de pouvoir suivre l'évolution de la croissance d'*Aspergillus westerdijkiae* en co-culture avec *Aspergillus ochraceus*, ces deux souches étant phénotypiquement peu différenciables, la méthodologie de « quantification » par analyse d'image des gels DGGE a été appliquée. Les seuils de concentration en compétiteur, à partir desquels apparaît l'inhibition de croissance et de la production en OTA ont pu être déterminés. Les mécanismes de compétition-inhibition ne sont pas liés à des mécanismes d'antibiose mais plutôt à une compétition nutritionnelle liée à des vitesses de croissance différentes. Les tests de compétition réalisés sur milieux carencés enrichis ou non en OTA ont permis de montrer une consommation de l'OTA par les souches compétitrices et qui se répercute positivement sur leur croissance au détriment de celle de la souche cible la plus productrice.

Afin de compléter cette étude, plusieurs perspectives se dégagent :

En ce qui concerne l'étude de la relation entre les profils DGGE des moisissures et la contamination en OTA du café vert, des améliorations de la méthodologie proposée pourraient être obtenues en utilisant des amorces plus spécifiques afin de

n'amplifier que l'ADN des espèces du genre *Aspergillus* et par la suite les séparer par DGGE. De plus une « quantification » relative par PCR-DGGE couplée à l'analyse d'image des différentes espèces sur le gel DGGE et notamment celles qui sont potentiellement d'importantes productrices d'OTA permettraient d'apporter des éléments de réponse supplémentaires.

Afin de consolider la spécificité de la technique de différenciation moléculaire entre souches de la section Circumdati (*Aspergillus westerdijkiae*/*Aspergillus ochraceus*) il conviendrait de tester cette technique avec un plus grand nombre de souches de ces deux espèces ainsi qu'avec des souches d'espèces différentes (comme par exemple *Aspergillus steynii*). Les résultats de ces essais permettraient de confirmer la possibilité d'étudier la biodiversité des souches de *A.westerdijkiae* et de *A.ochraceus* par cette méthode (distance de migration intraspécifiques et donc séquences différentes).

La robustesse de la méthode de « quantification » des différentes espèces par analyse d'image des gels DGGE pourrait être étudiée et améliorée par l'ajout d'un étalon interne.

Les résultats positifs obtenus au cours des tests de compétition/inhibition doivent être complétés en augmentant le nombre de souches testées dans les différentes espèces et envisageant des essais in vivo. De l'OTA ou des précurseurs de l'OTA marqués pourraient aussi être utilisés afin d'étudier le métabolisme impliqué dans la consommation de l'OTA que montrent les souches productrices dans certaines conditions.

Ces travaux ont fait l'objet de diverses publications :

- **Articles publiés dans des revues à facteur d'impact :**

- **Noël Durand**; Aly Farag El Sheikha, Ph.D.; Mirna-Leonor Suarez-Quiros; Oscar Gonzales-Rios; Nadège D Nganou; Angelique Fontana-Tachon; Didier Montet. Dynamics and Biodiversity of Fungi and Yeasts by PCR-DGGE, with the Objective of Understanding Ochratoxin Production on Coffee Beans. Food control. Soumis oct 2012.
- El Sheikha A., **Durand N.**, Sarter S., Okulo J.B., Montet D. 2012. Study of the microbial discrimination of fruits by PCR-DGGE : Application to the determination of the geographical origin of Physalis fruits from Colombia, Egypt, Uganda and Madagascar. *Food control*, **24** (1-2) : 57-63.
[20120126]. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.09.003>
- Kouakou A.C., N'Guessan K.F., **Durand N.**, Thomas D.A., Montet D., Koffi Djè M. 2012. Molecular bacterial characterization and free amino acids composition in Ivorian traditional fermented fish produced by two methods. *Fisheries Science*, **78** (5) : 1125-1136.[20121001]. <http://dx.doi.org/10.1007/s12562-012-0526-0>
- Nganou Donkeng N., **Durand N.**, Tatsadjieu L.N., Meile J.C., El Sheikha A., Montet D., Mbufung C.M. 2012. Determination of coffee origin by using 28S rDNA fingerprinting of fungal communities by PCR-DGGE: Application to the Cameroonian coffee. *International Journal of Biosciences*, **2** (5) : 18-30.[20120625].
<http://www.innspub.net/wp-content/uploads/IJB-V2No5-p18-30.pdf>
- Nganou Donkeng N., **Durand N.** Métayer I., Tatsadjieu Ngonne L., Montet D., Mbufung Carl M. Influence of post harvest processing on fungal diversity in Cameroonian coffee. Food control. Soumis Sept 2011.

- **Communications orales présentées lors de congrès internationaux :**

- Montet, D., **Durand, N.**, Fontana, A., Metayer, I., Gueule, D., Galindo-Schoor S. Study of the interspecific inhibition-competition phenomena in between ochratoxinogenic strains present on coffee. *Safefood Biotoxins Knowledge Network, Belfast (Ireland), 29th November 2012.*
- **Durand, N.**, El Sheikha, A., Suarez-Quiroz, M-L., Gonzalez-Rios, O., Meile, J-C., Nganou Donkeng, N., Galindo-Schoor, S., Fontana A., Pavon, C., Estrada, E., Macia, I., Martinez, A., Montet D. Dynamics and Biodiversity of microorganisms (fungi,

bacteria, yeast) by PCR-DGGE, linked to origin and post harvest treatments on coffee beans. *24st International Conference on Coffee Science, San José (Costa Rica), 12th - 16th November 2012.*

- **Durand, N.**, Manez, J-C., Bastide, P., Macia, I., Salazar, W., Guillent G., Porras-Andueza, M., Martinez, A., Montet D. Survey on OTA content in « Conventional » and « Grano de Oro » coffee types from Venezuela. *24st International Conference on Coffee Science, San José (Costa Rica), 12th - 16th November 2012.*
- Montet D., El Sheikha A., Suarez-Quiros M-L., Gonzales-Rios O., Nganou Donkeng N., **Durand N.** Conférence invité. Dynamics and Biodiversity of microorganisms (fungi and yeast) by PCR-DGGE, with the objective of understanding Ochratoxin production on coffee beans. 1st International CIGR Workshop on Food Safety: Advances and Trends,* *Dijon, 14-15 April 2011.
- Montet D., Le Nguyen D.D., El Sheikha A., Piro-Metayer I., **Durand N.**, Loiseau G., 2010. New molecular tools for tracing food: The Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) and perspectives of research in food safety. CRAW, Gembloux, Belgique, 16 Février.
- Montet D., Le Nguyen D.D., El Sheikha A., Piro-Metayer I., **Durand N.**, Loiseau G., 2010. New molecular tools for tracing food: The Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE). International Conference of Biology and Environment, Mansoura, Egypte, 15 au 17 Mars.
- **Durand N.**, El Sheikha A., Fontana-Tachon A., Montet D. 2009. PCR-DGGE applied to microbial ecology that influence the production of OTA [Abstract]. In : 12/2009, Montpellier, France. *Journée de l'UMR Qualisud "Mycotoxines" Démarches Intégrée pour des Produits Alimentaires de Qualité*, 10. s.l. : s.n., 1 p. Journée de l'UMR Qualisud "Mycotoxines" Démarches Intégrée pour des Produits Alimentaires de Qualité, 2009-12-10, Montpellier, France.

• **Posters présentées lors de congrès internationaux :**

- **Durand N.**, El Sheikha A., Fontana-Tachon A., Montet D. 2009. Dynamics and Biodiversity of microorganisms (fungi, yeast and bacteria) by PCR- 1 DGGE, influencing OTA production on coffee beans [Abstract]. In : Vienna, Austria. *ISM Conference: Worldwide Mycotoxin Reduction in Food and Feed Chains*, 9-11 September 2009, Tulln. s.l. : s.n., 1 p. International Society for Mycotoxicology (ISM) Conference, 2009-09-09/2009-09-11, Vienne, Autriche.

- **Durand N.**, El Sheikha A., Fontana-Tachon A., Montet D. 2009. PCR-DGGE applied to microbial ecology that influence the production of OTA [Abstract]. In : 12/2009, Montpellier, France. *Journée de l'UMR Qualisud "Mycotoxines" Démarches Intégrée pour des Produits Alimentaires de Qualité*, 10. s.l. : s.n., 1 p. Journée de l'UMR Qualisud "Mycotoxines" Démarches Intégrée pour des Produits Alimentaires de Qualité, 2009-12-10, Montpellier, France.
- **Durand N.**, El Sheikha A., Fontana-Tachon A., Montet D. 2009. Dynamics and biodiversity of microorganisms (funfi, yeast and bacteria) by PCR-DGGE, influencing OTA production on coffee beans. In : 12/2009, Brussels, Belgium. *Conference "How to trace the origin of food?"*, 02-03. s.l. : s.n., 3 p. Conference "How to trace the origin of food?", 2009-12-02/2009-12-03, Bruxelles, Belgique.
- **Durand N.**, El Sheikha A., Fontana-Tachon A., Montet D. 2009. Dynamics and biodiversity of microorganisms (funfi, yeast and bacteria) by PCR-DGGE, influencing OTA production on coffee beans [Abstract]. *Second Bi-Regional EU-SEA S&T Stakeholders Conference on Climate Change adaptation and mitigation - Strengthening SEA-EU S&T cooperation to find common solutions, November 11-12, 2009, Bogor, Indonesia*. s.l. : s.n., 1 p. Bi-Regional EU-SEA S&T Stakeholders Conference. 2, 2009-11-11/2009-11-12, Bogor, Indonésie. [20091207]. <http://pri-ristek.info/bogorconference>

Références bibliographiques

Références Bibliographiques

- Abarca, M.L., Bragulat, M.R., Castella, G. and Cabanes, F.J., 1994. Ochratoxin-a Production by Strains of *Aspergillus niger* Var *niger*. Applied and Environmental Microbiology 60: 2650-2652.
- Abarca, M.L., Accensi, F., Cano, J. and Cabanes, F.J., 2004. Taxonomy and significance of black *aspergilli*. Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology 86: 33-49.
- Aboul-Enein, H.Y., Kutluk, O.B., Altiocka, G. and Tuncel, M., 2002. A modified HPLC method for the determination of ochratoxin A by fluorescence detection. Biomed Chromatogr 16: 470-474.
- Abrunhosa, L., Paterson, R.R.M., Kozakiewicz, Z., Lima, N. and Venancio, A., 2001. Mycotoxin production from fungi isolated from grapes. Letters in Applied Microbiology 32: 240-242.
- Abrunhosa, L., Serra, R. and Venancio, A., 2002. Biodegradation of ochratoxin A by fungi isolated from grapes. Journal of Agricultural and Food Chemistry 50: 7493–7496.
- Abrunhosa, L., Santos, L. and Venancio, A., 2006. Degradation of ochratoxin A by proteases and by a crude enzyme of *Aspergillus niger*. Food Biotechnology 20: 231–242.
- Abrunhosa, L. and Venancio, A., 2007. Isolation and purification of an enzyme hydrolyzing ochratoxin A from *Aspergillus niger*. Biotechnology Letters 29: 1909–1914.
- Abrunhosa, L., Paterson, R. R. M. And Venancio, A., 2010. Biodegradation of ochratoxin A for food and feed decontamination. Toxins 2: 1078-99.
- Aguilera, A., Gomez, F., Lospitao, E. and Amils, R., 2006. A molecular approach to the characterization of the eukaryotic communities of an extreme acidic environment: Methods for DNA extraction and denaturing gradient gel electrophoresis analysis. Systematic and Applied Microbiology 29: 593-605.
- Ahmad, R, Magan, N., 2003 Monsooned coffee: impact of environmental factors on fungal community structure, enzyme production and ochratoxin. Ann Appl Biol 68: 161-168.
- Al-Anati, L. and Petzinger, E., 2006. Immunotoxic activity of ochratoxin A. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics 29: 79-90.

- Aldred, D., Cairns-Fuller, V., Magan, N. 2008. Environmental factors efficacy of some essentials oils and resveratrol to control growth and ochratoxin A production by *Penicillium verrucosum* and *Aspergillus westerdijkiae* on wheat grain. *Journal of Stored Products Research* 44: 341-346.
- Alldrick, A.J., 1996. The effects of processing on the occurrence of ochratoxin A in cereals. *Food Additives and Contaminants* 13: 27-28.
- Amézqueta, S., Gonzalez-Penas, E., Murillo, M. and Lopez de Cerain, A., 2005. Occurrence of ochratoxin A in cocoa beans: effect of shelling. *Food Additives and Contaminants* 22: 590-595
- Amezqueta, S., Gonzalez-Penas, E., Lizarraga, T., Murillo-Arbizu, M. and De Cerain, A.L., 2008. A simple chemical method reduces ochratoxin A in contaminated cocoa shells. *Journal of Food Protection* 71: 1422-1426.
- Amézqueta, S., Gonzalez-Penas, E., Murillo-Arbizu, M. and Lopez de Cerain, A. 2009. Ochratoxin A decontamination: a review. *Food Control* 20: 326-333.
- Ampe, F., Ben Omar, N., Moizan, C., Wachter, C. and Guyot, J.P., 1999. Polyphasic study of the spatial distribution of microorganisms in Mexican pozol, a fermented maize dough, demonstrates the need for cultivation-independent methods to investigate traditional fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 5464-5473.
- Andersen, B et Thrane, U., 1996. Differentiation of *Alternaria infectoria* and *Alternaria alternata* based on morphology, metabolite profiles, and cultural characteristics. *Canadian Journal of Microbiology*, 42 (7), 685-689
- Anli, R., Vural, N.; Bayram, M., 2011. Removal of Ochratoxin A (OTA) from Naturally Contaminated Wines during the Vinification Process. *Journal of the institute of brewing* 117: 456-46.
- ANSES, 2009. <http://www.anses.fr/Documents/RCCP-Ra-Mycotoxines2009.pdf>.
- Araguas, C., Gonzalez-Penas, E. and de Cerain, A.L., 2005. Study on ochratoxin A in cereal-derived products from Spain. *Food chemistry* 92: 459-464.
- Arroyo, M., Aldred, D. and Magan, N., 2008. Environmental factors and preservatives affect carbon utilization patterns and niche overlap of food spoilage fungi. *Fungal Ecology* 1: 24-32.
- Astoreca, A.L., Magnoli, C.E. and Dalcerro, A.M., 2010. Ecophysiology of *Aspergillus* Section *Nigri* Species Potential Ochratoxin A Producers. *Toxins* 2: 2593-2605.

- Atoui, A., Dao, H.P., Mathieu, F. and Lebrihi, A., 2006. Amplification and diversity analysis of ketosynthase domains of putative polyketide synthase genes in *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* producers of ochratoxin A. *Molecular Nutrition & Food Research* 50: 488-493.
- Atoui, A., Mathieu, F. and Lebrihi, A., 2007. Targeting a polyketide synthase gene for *Aspergillus carbonarius* quantification and ochratoxin A assessment in grapes using real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology* 115: 313-318.
- Avallone, S., Guiraud, J.P., Guyot, B., Olguin, E. and Brillouet, J.M., 2001a. Fate of mucilage cell wall polysaccharides during coffee fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49: 5556-5559.
- Avallone, S., Guyot, B., Brillouet, J.M., Olguin, E. and Guiraud, J.P., 2001b. Microbiological and biochemical study of coffee fermentation. *Current Microbiology* 42: 252-256.
- Avallone, S., Brillouet, J.M., Guyot, B., Olguin, E. and Guiraud, J.P., 2002. Involvement of pectolytic micro-organisms in coffee fermentation. *International journal of food science and technology* 37: 191-198.
- Aziz, N. H., Moussa, L. A. A., & Far, F. M. E., 2004. Reduction of fungi and mycotoxins formation in seeds by gamma-radiation. *Journal of Food Safety*, 24, 109–127.
- Bacha, N., Atoui, A., Mathieu, F., Liboz, T., & Lebrihi, A., 2009. *Aspergillus westerdijkiae* polyketide synthase “aoks1” is involved in the biosynthesis of ochratoxin A. *Fungal Genetics and Biology*, 46, 77-84.
- Bailly, H., Sallee, B. and Garcia, S.G., 1992. Improving the Quality of Coffee in the Xalapa-Coatepec Region of Mexico - Evaluation of Yields and Pulp Extraction. *Cafe Cacao The* 36: 55-61.
- Baltes, W. and Bochmann, G., 1987a. Model Reactions on Roast Aroma Formation .4. Mass-Spectrometric Identification of Pyrazines from the Reaction of Serine and Threonine with Sucrose under the Conditions of Coffee Roasting. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung* 184: 485-493.
- Baltes, W. and Bochmann, G., 1987b. Model Reactions on Roast Aroma Formation .5. Mass-Spectrometric Identification of Pyridines, Oxazoles, and Carbocyclic Compounds from the Reaction of Serine and Threonine with Sucrose under the

Conditions of Coffee Roasting. Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung 185: 5-9.

- Baltes, W. and Mevissen, L., 1988. Model Reactions on Roast Aroma Formation. 6. Volatile Reaction-Products from the Reaction of Phenylalanine with Glucose during Cooking and Roasting. Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung 187: 209-214.
- Barel, M., Jacquet, M., 1994. La qualité du café : ses causes, son appréciation, son amélioration. Plantations, recherche développement, 1 :5-13.
- Batista, L.R., Chalfoun, S.M., Prado, G., Schwan, R.F. and Wheals, A.E., 2003. Toxigenic fungi associated with processed (green) coffee beans (*Coffea arabica* L.). International Journal of Food Microbiology 85: 293-300.
- Battilani, P. and Pietri, A., 2002. Ochratoxin A in grapes and wine. European Journal of Plant Pathology 108: 639-643.
- Bau, M., Castella, G., Bragulat, M.R. and Cabanes, F.J., 2006. RFLP characterization of *Aspergillus niger* aggregate species from grapes from Europe and Israel. International Journal of Food Microbiology 111: S18-S21.
- Baumann, T.W. and Rohrig, L., 1989. Formation and Intracellular Accumulation of Caffeine and Chlorogenic Acid in Suspension-Cultures of *Coffea-Arabica*. Phytochemistry 28: 2667-2669.
- Baumann, T.W., Mosli, S.S., Schulthess, B.H., Aerts, R.J., 1993. Interdependence of caffeine and chlorogenic acid (5-CQA) metabolism in coffee. In 15^e colloque ASIC. Montpellier, France: 134-140.
- Baxter, E.D., 1996. The fate of ochratoxin A during malting and brewing. Food additives and contaminants 13: 23-24.
- Baxter, E.D., Slaiding, I.R. and Kelly, B., 2001. Behavior of ochratoxin A in brewing. Journal of the American Society of Brewing Chemists 59: 98-100.
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P. and Lebrihi, A., 2004. Ochratoxin A removal in synthetic and natural grape juices by selected oenological *Saccharomyces* strains. Journal of Applied Microbiology 97: 1038-1044.
- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P. and Lebrihi, A., 2005. Conidia of black *Aspergilli* as new biological adsorbents for ochratoxin A in grape juices and musts, 2005. Journal of Agricultural and Food Chemistry 5: 8224-8229.

- Bejaoui, H., Mathieu, F., Taillandier, P. and Lebrihi, A., 2006. Biodegradation of ochratoxin A by *Aspergillus* section *Nigri* species isolated from French grapes: A potential means of ochratoxin A decontamination in grape juices and musts. *FEMS Microbiology Letters* 255: 203–208.
- Belajova, E., Rauova, D. and Dasko, L., 2007. Retention of ochratoxin A and fumonisin B1 and B2 from beer on solid surfaces: comparison of efficiency of adsorbents with different origin. *European Food Research and Technology* 224: 301-308.
- Belhadj, A., Saigne, C., Telef, N., Cluzet, S., Bouscaut, J., Corio-Costet, M.F. and Merillon, J.M., 2006. Methyl jasmonate induces defense responses in grapevine and triggers protection against *Erysiphe necator*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 9119-9125.
- Belli, N., Ramos, A.J., Sanchis, V., Marin, S., 2004. Incubation time and wateractivity effects on ochratoxin A production by *Aspergillus* section *Nigri* strains isolated from grapes. *Letters in Applied Microbiology*, 38: 72-77.
- Bent, A.F. and Mackey, D., 2007. Elicitors, effectors, and R genes: The new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annual Review of Phytopathology* 45: 399-436.
- Beretta, B., De Domenico, R., Gaiaschi, A., Ballabio, C., Galli, C.L., Gigliotti, C. and Restani, P., 2002. Ochratoxin A in cereal-based baby foods: occurrence and safety evaluation. *Food additives and contaminants* 19: 70-75.
- Bhat, R., Sridhar, K.R. and Karim, A.A., 2010. Microbial quality evaluation and effective decontamination of nutraceutically valued lotus seeds by electron beams and gamma irradiation. *Radiation Physics and Chemistry* 79: 976-981.
- Biratu, T., 1997. Effects of caffeine on coffee berry disease / *Colletotrichum kahawae*. In 17^e colloque ASIC. Nairobi. Kenya : 727-733.
- Blanc M, Pittet R, Munoz-Box R, Viani R., 1998. Behavior of Ochratoxin A during green coffee roasting and soluble soluble coffee manufacture. *J Agr Food Chem*; 46: 673-75.
- Blesa, J., Soriano, J.M., Molto, J.C. and Manes, J., 2004. Concentration of ochratoxin A in wines from supermarkets and stores of Valencian Community (Spain). *Journal of chromatography a* 1054: 397-401.

- Bleve, G., Grieco, F., Cozzi, G., Logrieco, A. and Visconti, A., 2006. Isolation of epiphytic yeast with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *International Journal of Food Microbiology* 108: 204–209.
- Bondy, GS, Pestka, J.J., 2000. Immunomodulation by fungal toxins. *Journal of toxicology and environmental health* 3: 109-143.
- Boorman, G.A., Hong, H.L., Dieter, M.P., Hayes, H.T., Pohland, A.E., Stack, M. and Luster, M.I., 1984. Myelotoxicity and Macrophage Alteration in Mice Exposed to Ochratoxin-A. *Toxicology and Applied Pharmacology* 72: 304-312.
- Bordas, E., Bretter, E., Costin, L., Lenghel L., 1973. Etude épidémiologique de la néphropathie. *Rev. Epidem. Méd. Soc. et santé Publ.*, 21 : 481- 498.
- Boudra, H., Le Bars, P., Le Bars, J., 1995. Thermostability of Ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 1156-1159.
- Bragulat, M.R., Abarca, M.L. and Cabanes, F.J., 2001. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in pure culture. *International Journal of Food Microbiology* 71: 139-144.
- Breitholtz-Emanuelsson, A; Palminger-Hallen, I; Wohlin, P O; Oskarsson, A; Hult, K; Olsen, M, 1993. Transfer of ochratoxin A from lactating rats to their offspring: a short-term study. *Natural toxins* Volume: 1 Issue: 6 Pages: 347-52
- Brera, C., Soriano, J.M., Debegnach, F. and Miraglia, M., 2005. Exposure assessment to ochratoxin A from the consumption of Italian and Hungarian wines. *Microchemical Journal* 79: 109-113.
- Bruggemann, J., Stephen, J.R., Chang, Y.J., Macnaughton, S.J., Kowalchuk, G.A., Kline, E. and White, D.C., 2000. Competitive PCR-DGGE analysis of bacterial mixtures: an internal standard and an appraisal of template enumeration accuracy. *J Microbiol Methods* 40: 111-123.
- Bu'Lock, J.D., Jacquet, J., 1965. Secondary metabolism: an explanation in terms of induced enzyme mechanisms. *Experimental*, 21: 55-56.
- Bucheli, P., Kanchanomai, C., Meyer, I. and Pittet, A., 2000. Development of ochratoxin A during Robusta (*Coffea canephora*) coffee cherry drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 1358-1362.

- Bucheli, P. & Taniwaki, M. H., 2002, Review Research on the origin, and on the impact of post-harvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee. *Food Additives and Contaminants*, 19 (7): 655-665.
- Bünger, J., Westphal, G., Monnich, A., Hinnendahl, B., Hallier, E., Müller, M., 2004. Cytotoxicity of occupationally and environmentally relevant mycotoxins. *Toxicology*, 202: 199-211.
- Burdaspal, P.A., Legarda, T.M. 1998. Ochratoxin A in commercial coffee in Spain. *Alimentaria* 31-35.
- Burdaspal, P.A., Legarda, T.M., 1999. Ochratoxin A in wines and grape products originating from Spain and other European countries. *Alimentaria* 36, 107–113.
- Cabanes, F.J., Bragulat, M.R. and Castella, G., 2010. Ochratoxin a producing species in the genus *penicillium*. *Toxins (Basel)* 2: 1111-1120.
- Canadas, D., 2006. Evaluation du procédé Oxygreen® pour son potentiel de décontamination en ochratoxine A du blé. Les effets toxiques liés à une exposition subchronique à l'ochratoxine A sont-ils atténués? Thèse de Doctorat. Institut National Polytechnique de Toulouse, France.
- Caridi, A., Galvano, F., Tafur, A. and Ritieni, A., 2006a. In-vitro screening of *Saccharomyces* strains for ochratoxin A removal from liquid medium. *Annals of Microbiology* 56: 135-137.
- Caridi, A., Galvano, F., Tafur, A. and Ritieni, A., 2006b. Ochratoxin A removal during winemaking. *Enzyme and Microbial Technology* 40: 122-126.
- Castegnaro, M. And Pfohl-Leszkowicz, A., 2002. Les mycotoxines: Contaminations omniprésentes dans l'alimentation animale et humaine. In : Moll, M. and Moll, N. (eds) *La sécurité alimentaire du consommateur*. Lavoisier, Paris, France, pp. 127-179.
- Castegnaro, M , Canadas, D , Vrabcheva, T , Petkova-Bocharova, T , Chernozemsky, IN , Pfohl-Leszkowicz, A, 2006. Balkan endemic nephropathy: Role of ochratoxins A through biomarkers. *Molecular Nutrition & Food Research* 50 Issue: 6 519-529.
- Castellanos-Onorio, O., Gonzalez-Rios, O., Guyot, B., Fontana, T.A., Guiraud, J.P., Schorr-Galindo, S., Durand, N. and Suarez-Quiroz, M., 2011. Effect of two different roasting techniques on the Ochratoxin A (OTA) reduction in coffee beans (*Coffea arabica*). *Food Control* 22: 1184-1188.

- Cecchini, F., Morassut, M., Moruno, E.G. and Di Stefano, R., 2006. Influence of yeast strain on ochratoxin A content during fermentation of white and red must. *Food Microbiology* 23 : 411-417.
- Chan, G.F., Puad, M.S.A., Chin, C.F. and Rashid, N.A.A., 2011. Emergence of *Aureobasidium pullulans* as human fungal pathogen and molecular assay for future medical diagnosis. *Folia Microbiologica* 56: 459-467.
- Chang, C.F. and Hamilton, P.B., 1980. Impairment of Phagocytosis by Heterophils from Chickens during Ochratoxicosis. *Applied and Environmental Microbiology* 39: 572-575.
- Charrier, A., Eskes, AB., 1997. Les caféiers. *L'amélioration des plantes tropicales*. CIRAD et ORSTOM. Paris, France. 171–196.
- Chernozemsky, I.N., Stoyanov, I.S., Petkova-Bocharova, T.K., Nicolov, I.G., Draganov, I.G., Stoichev, I., Tanchev, Y., Naidenov, D., Kalcheva, N.D., 1977, Geographic correlation between the occurrence of endemic nephropathy and urinary tract tumours in Vratza district. *Bulgaria international journal of cancer*, 19: 1-11.
- Chiavaro, E., Lepiani, A., Colla, F., Bettoni, P., Pari, E. and Spotti, E., 2002. Ochratoxin A determination in ham by immunoaffinity clean-up and quick fluorimetric method. *Food Additives and Contaminants* 19: 575-581.
- Chiotta, M.L., Susca, A., Stea, G., Mule, G., Perrone, G., Logrieco, A. and Chulze, S.N., 2011. Phylogenetic characterization and ochratoxin A - Fumonisin profile of black *Aspergillus* isolated from grapes in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 149: 171-176.
- Clarke, R., Macrae, J. R., 1985. Water and mineral contents. *Coffee*. Elsevier Applied Science Publisher. London and New York. Vol 1: Chemistry, 42–82.
- Clifford, M.N., 1985. Chlorogenic acids. *Coffee*. Elsevier Applied Science Publisher. London and New York. Vol 1: Chemistry, 153–202.
- Clifford, M.N., and Staniforth, P.S., 1977. A critical comparison of six spectrophotometric methods for measuring chlorogenic acids in green coffee beans. In 8^e colloque ASIC. Abidjan, Côte D'ivoire. 109-113.
- Clifford, M.N. and Ramirez Martinez, J.R., 1991a. Phenols and Caffeine in Wet-Processed Coffee Beans and Coffee Pulp. *Food chemistry* 40: 35-42.
- Clifford, M.N. and Ramirez Martinez, J.R., 1991b. Tannins in Wet-Processed Coffee Beans and Coffee Pulp. *Food chemistry* 40: 191-200.

- Cocolin, L., Bisson, L.F. and Mills, D.A., 2000. Direct profiling of the yeast dynamics in wine fermentations. *Fems Microbiology Letters* 189: 81-87.
- Cocolin, L., Heisey, A. and Mills, D.A., 2001. Direct identification of the indigenous yeasts in commercial wine fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture* 52: 49-53.
- Cocolin, L., Aggio, D., Manzano, M., Cantoni, C. and Comi, G., 2002a. An application of PCR-DGGE analysis to profile the yeast populations in raw milk. *International Dairy Journal* 12: 407-411.
- Cocolin, L., Manzano, M., Rebecca, S. and Comi, G., 2002b. Monitoring of yeast population changes during a continuous wine fermentation by molecular methods. *American Journal of Enology and Viticulture* 53: 24-27.
- Cocolin, L. and Mills, D.A., 2003. Wine yeast inhibition by sulfur dioxide: A comparison of culture-dependent and independent methods. *American Journal of Enology and Viticulture* 54: 125-130.
- Creppy, E.E., Kane, A., Dirheimer, G., Lafargefrayssinet, C., Mousset, S. and Frayssinet, C., 1985. Genotoxicity of Ochratoxin-a in Mice - DNA Single-Strand Break Evaluation in Spleen, Liver and Kidney. *Toxicology Letters* 28: 29-35.
- Creppy, E.E., 1999. Human ochratoxicosis. *J. Toxicol.-Toxin Rev.*, 18, 277–293.
- Dachoupakan, C., Ratomahenina, R., Martinez, V., Guiraud, J.P., Baccou, J.C. and Schorr-Galindo S., 2009a. Study of phenotypic and genotypic biodiversity of potentially ochratoxigenic black *aspergilli* isolated from grapes. *International Journal of Food Microbiology* 132: 14-23.
- Dachoupakan, C., Ratomahenina, R., Martinez, V., Guiraud, J.P., Baccou, J.C. and Schorr-Galindo S., 2009b. Impact of plant defense stimulation on biodiversity of black *aspergilli* and physico-chemical changes of grapes including OTA content. ISM conference 2009 “Worldwide mycotoxin reduction in food and feed chains”, 9-11 September 2009, Tulln, Austria. (Oral communication).
- Dall'Asta, C., Galaverna, G., Dossena A., Marchelli, R., 2004. Reversed-phase liquid chromatographic method for the determination of ochratoxin A in wine. *Journal of Chromatographic A*, 1024: 275-279.
- Dao, H.P.; Mathieu, F.; Lebrihi, A. 2005. Two primer pairs to detect OTA producers by PCR method. *Int. J. Food Microbiol.*, 104, 61–67

- De Felice, D.V., Solfrizzo, M., De Curtis, F., Lima, G., Visconti, A. and Castoria, R., 2008. Strains of *Aureobasidium pullulans* can lower Ochratoxin A contamination in wine grapes. *Phytopathology* 98: 1261-1270.
- De Rossi, P., Ricelli, A., Reverberi, M., Bello, C., Fabbri, A.A, Fanelli, C., De Rossi, A., Corradini, D. and Nicoletti I., 2012. Grape variety related trans-resveratrol induction affects *Aspergillus carbonarius* growth and ochratoxin A biosynthesis. *International Journal of Food Microbiology* 156: 127-132.
- De Vries, R.P., Frisvad, J.C., van de Vondervoort, P.J.I., Burgers, K., Kuijpers, A.F.A., Samson, R.A. and Visser, J., 2005. *Aspergillus vadensis*, a new species of the group of black *Aspergilli*. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 87: 195-203.
- Degola, F., Berni, E. and Restivo, F.M., 2011. Laboratory tests for assessing efficacy of atoxigenic *Aspergillus flavus* strains as biocontrol agents. *International Journal of Food Microbiology* 146: 235-243.
- Del Prete, V., Rodriguez, H., Carrascosa, A.V., Rivas, B.D.L., Garcia-Moruno, E. and Munoz, R., 2007. In vitro removal of ochratoxin a by wine lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection* 70: 2155-2160.
- Delage, N., d'Harlingue, A., Colonna Ceccaldi, B., Bompeix, G., 2003. Occurrence of mycotoxins in fruit juices and wine. *Food control*, 14: 225-227.
- Diez, B., Pedros-Alio, C., Marsh, T.L. and Massana, R., 2001a. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2942-2951.
- Diez, B., Pedros-Alio, C. and Massana, R., 2001b. Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 2932-2941.
- Djossou, O., Perraud-Gaime, I., Mirleau, F.L., Rodriguez-Serrano, G., Karou, G., Niamke, S., Ouzari, I., Boudabous, A. and Roussos, S., 2011. Robusta coffee beans post-harvest microflora: *Lactobacillus plantarum* sp as potential antagonist of *Aspergillus carbonarius*. *Anaerobe* 17: 267-272.
- Domijan, A.M., Peraica, M., Miletic-Medved, M., Lucic, A. and Fuchs, R., 2003. Two different clean-up procedures for liquid chromatographic determination of ochratoxin

A in urine. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences 798: 317-321.

- Dorrenhaus, A. and Follmann, W., 1997. Effects of ochratoxin A on DNA repair in cultures of rat hepatocytes and porcine urinary bladder epithelial cells. Archives of Toxicology 71: 709-713.
- Durand, N., Bertrand, B., Guyot, B., Guiraud, J.P. and Fontana Tachon, A., 2009. Study on the *Coffea arabica/Colletotrichum kahawae* pathosystem: Impact of a biological plant protection product. Journal of Plant Diseases and Protection 116: 78-85.
- Duris, D., Mburu, J.K., Durand, N., Clarke, R., John, M. and Guyot, B., 2010. Ochratoxin A contamination of coffee batches from Kenya in relation to cultivation methods and post-harvest processing treatments. Food Additives and Contaminants Part A – Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment 27: 836-841.
- Dwivedi, P. and Burns, R.B., 1984. Effect of Ochratoxin A on Immunoglobulins in Broiler Chicks. Research in Veterinary Science 36: 117-121.
- Echandi, E., Fernandez, C.E., 1962. Relacion entre el contenido de acido chlorogenico y la resistencia a la Haga macana o cancer de los cafetos causados por *Ceratocystis fimbriata*. Turrialba, Costa Rica. 12, 87-90.
- Edwards, S.G., O'Callaghan, J., Dobson, A.D.W., 2002. PCR-based detection and quantification of mycotoxigenic fungi. Mycological Resesearch, 106: 1005 – 1025.
- EFSA. 2009. Review of mycotoxin-detoxifying agents used as feed additives: mode of action, efficacy and feed/food safety. Scientific report CFP/EFSA/FEEDAP/2009/01.
- El Khoury, A. and Atoui, A., 2010. Ochratoxin a: general overview and actual molecular status. Toxins (Basel) 2: 461-493.
- El Sheikha, A.F., Condur, A., Metayer, I., Nguyen, D.D., Loiseau, G. and Montet, D., 2009. Determination of fruit origin by using 26S rDNA fingerprinting of yeast communities by PCR-DGGE: preliminary application to Physalis fruits from Egypt. Yeast 26: 567-573.
- El Sheikha, A. F., 2010. Determination of the geographical origin of fruits by using 26S rDNA fingerprinting of yeast communities by PCR-DGGE: An application to Shea tree fruits. Journal of Life Sciences. 4, 9-15.

- El Sheikha, A.F. and Montet, D., 2011. Determination of fruit origin by using 28S rDNA fingerprinting of fungi communities by PCR-DGGE: an application to Physalis fruits from Egypt, Uganda and Colombia. *Fruits* 66: 79-89.
- Elad, Y., 1994. Biological control of grape grey mould by *Trichoderma harzianum*. *Crop Protection* 13: 35-38.
- Ercolini, D., 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods* 56: 297-314.
- Eskola, M., 2002. Study on trichothecenes, zearalenone and ochratoxin A in finnish cereals: occurrence and analytical techniques. EELA Julkaisuja Publications, 3: 1-78.
- European Commission, 1993. Regulation (EC) 315/93 of 8/02/1993. Laying down Community procedures for contaminants in food.
- European Commission, 2002. Task 3.2.7 "Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states". Rome, Italy, January. Available at: http://ec.europa.eu/food/fs/scoop/3.2.7_en.pdf.
- European Commission. Commission Regulation (EC) No 123/2005 of 26 January 2005 amending Regulation (EC) No 466/2001 as regards ochratoxin A. *Off. J. Eur. Commun.* 2005, 25, 3–5.
- European Commission, 2006. Regulation (EC) 1881/2006 of 19/12/2006. *Official Journal of the European Communities* L 364: 5–24.
- FAO, 2006. Reducing ochratoxin A in coffee. <http://www.coffee-ota-org> (03.02.06).
- FAO/WHO, 1999. Evaluation of certain food additives and contaminants. *Forty-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert committee on food additives*. WHO technical report series no. 884
- FAO/WHO, 2001a. Evaluation of certain mycotoxins that contaminate food. Geneva, Switzerland, 6-15 February 2001.
- FAO 2001b Manual on the application of the HACCP system in mycotoxin prevention and control. *Food and Nutrition Paper*, 73.
- FAO 2008: CODEX committee on food import and export inspection and certificationsystems(<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/securite-sanitaire-et-qualite-des-aliments/topical-issues/mycotoxins/fr/>)

- Faucet-Marquis V., 2005. L'ochratoxine A, contaminant alimentaire, est-elle un cancérogène génotoxique ou épigénétique ? Recherche des effets génotoxiques par la technique de post-marquage de l'ADN au 32P en relation avec la métabolisation de l'ochratoxine A. Thèse de Doctorat, Toulouse, France.
- Felske, A., Akkermans, A.D. and De Vos, W.M., 1998. Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. *Appl Environ Microbiol* 64: 4581-4587.
- Fernandez-Gonzalez, M., Espinosa, J.C., Ubeda, J.F. and Briones, A.I., 2001. Yeasts present during wine fermentation: Comparative analysis of conventional plating and PCR-TTGE. *Systematic and Applied Microbiology* 24: 634-638.
- Ferraz MBM, Farah A, Iamanaka BT., 2010. Kinetics of ochratoxin A destruction during coffee roasting. *Food Control* 21: 872-7.
- Ferrufino-Guardia, E.V., Tangni, E.K., Larondelle, Y. and Ponchaut, S., 2000. Transfer of ochratoxin A during lactation: exposure of suckling via the milk of rabbit does feed a naturally-contaminated feed. *Food Additives and Contaminants* 17: 167-175.
- Filali, A., Ouammi, L., Betbeder, A.M., Baudrimont, I., Soulaymani, R., Benayada, A. and Creppy, E.E., 2001. Ochratoxin A in beverages from Morocco: a preliminary survey. *Food additives and contaminants* 18: 565-568.
- Filtenborg, O., Frisvad, J.C. and Thrane, U., 1996. Moulds in food spoilage. *International Journal of Food Microbiology* 33: 85-102.
- Follmann, W., Hillebrand, I.E., Creppy, E.E., Bolt, H.M., 1995. Sister chromatid exchange frequency in cultured isolated porcine urinary bladder epithelial cells (PUBEC) treated with ochratoxin A and *Archive of Toxicology*, 69: 280-286.
- Follmann, W. and Lucas, S., 2003. Effects of the mycotoxin ochratoxin A in a bacterial and a mammalian in vitro mutagenicity test system. *Archives of Toxicology* 77: 298-304.
- Folstar, P, 2001. Lipids. In *Coffee: Chemistry*; Clarke, R. J., Macrae, R., Eds.; Elsevier Applied Science Publishers: London, Vol. 1, pp 203–222.
- Frank J. M. 2001, On the Activity of Fungi in Coffee in Relation toOchratoxin A Production. In 19th ASIC Coffee Conference, Trieste, Italy. 14-18 May.,

- Frisvad, J.C., Frank, J.M., Houbraken, J.A.M.P., Kuijpers, A.F.A. and Samson, R.A., 2004. New Ochratoxin A producing species of *Aspergillus* section *Circumdati*. *Studies in Mycology*, 50: 23-43.
- Frisvad, J.C., Skouboe, P. and Samson, R.A., 2005. Taxonomic comparison of three different groups of aflatoxin producers and a new efficient producer of aflatoxin B-1, sterigmatocystin and 3-O-methylsterigmatocystin, *Aspergillus rambellii* sp. nov. *Systematic and Applied Microbiology* 28: 442-453.
- Fromin, N., Hamelin, J., Tarnawski, S., Roesti, D., Jourdain-Miserez, K., Forestier, N., Teyssier-Cuvelle, S., Gillet, F., Aragno, M. and Rossi, P., 2002. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology* 4: 634-643.
- Froquet, R., Le Drean, G. and Parent-Massin, D., 2003. Effect of Ochratoxin A on human haematopoietic progenitors proliferation and differentiation: an in vitro study. *Human & Experimental Toxicology* 22: 393-400.
- Fuchs, S., Sontag, G., Stidl, R., Ehrlich, V., Kundi, M. and Knasmüller, S., 2008. Detoxification of patulin and ochratoxin A, two abundant mycotoxins, by lactic acid bacteria. *Food and Chemical Toxicology* 46: 1398-1407.
- Full, G., Lonzarich, V., Suggi-Liverani, F., 1999. Differences in chemical composition of electronically stored green coffee beans. *Association Scientifique Internationale du Café*. In: *Proceedings of the 19th International Conference on Coffee Science*, Helsinki, Finland.
- Galagan, J.E., Calvo, S.E., Cuomo, C., Ma, L.J., Wortman, J.R., Batzoglou, S., Lee, S.I., Basturkmen, M., Spevak, C.C., Clutterbuck, J., Kapitonov, V., Jurka, J., Scazzocchio, C., Farman, M., Butler, J., Purcell, S., Harris, S., Braus, G.H., Draht, O., Busch, S., D'Enfert, C., Bouchier, C., Goldman, G.H., Bell-Pedersen, D., Griffiths-Jones, S., Doonan, J.H., Yu, J., Vienken, K., Pain, A., Freitag, M., Selker, E.U., Archer, D.B., Penalva, M.A., Oakley, B.R., Momany, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Asai, K., Machida, M., Nierman, W.C., Denning, D.W., Caddick, M., Hynes, M., Paoletti, M., Fischer, R., Miller, B., Dyer, P., Sachs, M.S., Osmani, S.A. and Birren, B.W., 2005. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A.fumigatus* and *A.oryzae*. *Nature* 438: 1105-1115.
- Gallaz L, Stalder R., 1976. Ochratoxin A im Kaffee. *Chemie Microbiologie Technologie der Lebensmittel* 4: 147-149.

- Galtier, P; Alvinerie, M, 1976. In vitro transformation of ochratoxin A by animal microbial floras. Annales de recherches veterinaires. Annals of veterinary research 7: 91-8.
- Garcia, R., Arriola, D., Dearriola, M.C., Deporres, E. and Rolz, C., 1991. Characterization of Coffee Pectin. Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie 24: 125-129.
- Gatto, V. and Torriani, S., 2004. Microbial population changes during sourdough fermentation monitored by DGGE analysis of 16S and 26S rRNA gene fragments. Annals of Microbiology 54: 31-42.
- Gelsomino, A., Keijzer-Wolters, A.C., Cacco, G. and van Elsas, J.D., 1999. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. Journal of Microbiological Methods 38: 1-15.
- Gil-Serna, J., Alvarez, B.P., Gonzalez-Jaen, M.T. and Estevez, C.V., 2009. Biocontrol of *Aspergillus ochraceus* by yeasts. Current Research Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology: 368-372.
- Gil-Serna, J., Patino, B., Cortes, L., Gonzalez-Jaen, M.T. and Vazquez, C., 2011a. Mechanisms involved in reduction of ochratoxin A produced by *Aspergillus westerdijkiae* using *Debaryomyces hansenii* CYC 1244. International Journal of Food Microbiology 151: 113-118.
- Gil-Serna, J., Vazquez, C., Sardinias, N., Gonzalez-Jaen, M.T. and Patino, B., 2011b. Revision of ochratoxin a production capacity by the main species of *Aspergillus* section *Circumdati* *Aspergillus steynii* revealed as the main risk of OTA contamination. Food Control 22: 343-345.
- Gimeno A., 2000. Micotoxinas, introduction. XVII Congreso Centroamericano y del Caribe de Avicultura. <http://www.engormix.com>.
- Golinski, P., Kostecki, M., Lasocka, I., Wisniewska, H., Chelkowski, J. and Kaczmarek, Z., 1996. Moniliformin accumulation and other effects of *Fusarium avenaceum* (Fr) Sacc on kernels of winter wheat cultivars. Journal of Phytopathology-Phytopathologische Zeitschrift 144: 495-499.
- Gomes, N.C.M., Fagbola, O., Costa, R., Rumjanek, N.G., Buchner, A., Mendona-Hagler, L. and Smalla, K., 2003. Dynamics of fungal communities in bulk and maize

rhizosphere soil in the tropics. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 3758-3766.

- Gonzalez, L., Juan, C., Soriano, J.M., Molto, J.C. and Manes, J., 2006. Occurrence and daily intake of ochratoxin A of organic and non-organic rice and rice products. *International Journal of Food Microbiology* 107: 223-227.
- Gonzalez-Salgado, A., Patino, B., Vazquez, C. and Gonzalez-Jaen, M.T., 2005. Discrimination of *Aspergillus niger* and other *Aspergillus* species belonging to section *Nigri* by PCR assays. *Fems Microbiology Letters* 245: 353-361.
- Gopinandhan, T.N., Kannan, G.S., Panneerselvam, P., Velmourougane, K., Raghuramulu, Y. and Jayarama, 2008. Survey on ochratoxin A in Indian green coffee destined for export. *Food Additives & Contaminants Part B-Surveillance* 1: 51-57.
- Griffiths, B.S., Ritz, K., Bardgett, R.D., Cook, R., Christensen, S., Ekelund, F., Sorensen, S.J., Baath, E., Bloem, J., de Ruiter, P.C., Dolfing, J. and Nicolardot, B., 2000. Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity-ecosystem function relationship. *Oikos* 90: 279-294.
- Grosse, Y., Baudrimont, I., Castegnaro, M., Betbeder, A.M., Creppy, E.E., Dirheimer, G. and Pfohlleszkowicz, A., 1995. Formation of Ochratoxin-a Metabolites and DNA-Adducts in Monkey Kidney-Cells. *Chemico-Biological Interactions* 95: 175-187.
- Grosso, F., Said, S., Mabrouk, I., Fremy, J.M., Castegnaro, M., Jemmali, M. and Dragacci, S., 2003. New data on the occurrence of ochratoxin A in human sera from patients affected or not by renal diseases in Tunisia. *Food and Chemical Toxicology* 41: 1133-1140.
- Gueule, D., [Guyot, B.](#), [Suarez Quiroz, M.](#), [Guiraud, J-P.](#), 2006. Black *Aspergillus* species, OTA producers. Conditions for their growth and toxicogenesis in coffee. In 21^e colloque ASIC. Montpellier. France *ASIC*. 213-219.
- Guiraud, J.P., 1998. Microbiologie alimentaire. Technique et ingénierie. Série Agro-Alimentaire. Dunod Ed., Paris.
- Hahlbrock, K., Grisebach, H., 1979. Enzymic controls in the biosynthesis of lignin and flavonoids. *Annu. Rev. Plant Physiol*, 30 : 105-130.

- Hamari, Z., Kevei, F., Kovacs, E., Varga, J., Kozakiewicz, Z. and Croft, J.H., 1997. Molecular and phenotypic characterization of *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* strains with special regard to their mitochondrial DNA polymorphisms. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 72: 337-347.
- Harman, G.E., Latorre, B., Agosin, E., San Martin, R., Riegel, D.G., Nielsen, P.A., Tronsmo, A. and Pearson P.R., 1996. Biological and Integrated Control of *Botrytis* Bunch Rot of Grape Using *Trichoderma* spp. *Biological Control* 7: 259-266.
- Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I. and Lorito, M., 2004. *Trichoderma* species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2: 43-56.
- Harris, J.P. and Mantle, P.G., 2001. Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry*, 58: 709 – 716.
- Harvey, R.B., Kubena, L.F., Elissalde, M.H., Rottinghaus, G.E. and Corrier, D.E., 1994. Administration of Ochratoxin A and Ochratoxin T-2 Toxin to growing swine. *American Journal of Veterinary Research* 55: 1757-1761.
- Hassen, W.; Abid-Essafi, S.; Achour, A.; Guezzah, N.; Zakhama, A.; Ellouz, F.; Creppy, E.E.; Bacha, H, 2004. Karyomegaly of tubular kidney cells in human chronic interstitial nephropathy in Tunisia: Respective role of Ochratoxin A and possible genetic predisposition. *Hum. Exp. Toxicol.*, 23, 339–346
- Haugland, R.A., Brinkman, N. and Vesper, S.J., 2002. Evaluation of rapid DNA extraction methods for the quantitative detection of fungi using real-time PCR analysis. *Journal of Microbiological Methods* 50: 319-323.
- Heenan, C.N., Shaw, K.J., Pitt, J.I., 1998. Ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus niger* isolates and detection using coconut cream agar. *Journal of Food Mycology*, 1: 67 – 72.
- Heilman W., Rehfeldt A. G. & Rotzoll F., 1999, Behaviour and reduction of ochratoxin A in green coffee beans in response to various processing methods. *European Food Research Technology*, 209: 297-300.
- Henri-Dubernet, S., Desmasures, N. and Gueguen, M., 2004. Culture-dependent and culture-independent methods for molecular analysis of the diversity of *Lactobacilli* in "Camembert de Normandie" cheese. *Lait* 84: 179-189.

- Hermosa, M.R., Grondona, I., Diaz-Minguez, J.M., Iturriaga, E.A. and Monte, E., 2001. Development of a strain-specific SCAR marker for the detection of *Trichoderma atroviride* 11, a biological control agent against soilborne fungal plant pathogens. *Curr Genet* 38: 343-350.
- Hernan-Gomez, S., Espinosa, J.C. and Ubeda, J.F., 2000. Characterization of wine yeasts by temperature gradient gel electrophoresis (TGGE). *Fems Microbiology Letters* 193: 45-50.
- Hesham, A.E., Khan, S., Liu, X.C., Zhang, Y., Wang, Z.Y. and Yang, M., 2006. Application of PCR-DGGE to analyse the yeast population dynamics in slurry reactors during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in weathered oil. *Yeast* 23: 879-887.
- Heyndrickx, M., Vauterin, L., Vandamme, P., Kersters, K. and DeVos, P., 1996. Applicability of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. *Journal of Microbiological Methods* 26: 247-259.
- Hickey, P.W., Sutton, D.A., Fothergill, A.W., Rinaldi, M.G., Wickes, B.L., Schmidt, H.J. and Walsh, T.J., 2009 *Trichosporon mycotoxinivorans*, a Novel Respiratory Pathogen in Patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* 47: 3091-3097.
- Hilmer A. Frank, N.A.L., and Amy S. Dela Cruz, 1965. Bacteria Responsible for Mucilage-Layer Decomposition in Kona Coffee Cherries. *Appl. Environ. Microbiol.* vol. 13 201-207
- Hinrikson, H.P., Hurst, S.F., Lott, T.J., Warnock, D.W. and Morrison, C.J., 2005. Assessment of ribosomal large-subunit D1-D2, internal transcribed spacer 1, and internal transcribed spacer 2 regions as targets for molecular identification of medically important *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 43: 2092-2103.
- Hult, K., Teiling, A. and Gatenbeck, S., 1976. Degradation of Ochratoxin-a by a Ruminant. *Applied and Environmental Microbiology* 32: 443-444.
- Hurst, M.J and Martin, R.A., 1998. High-performance liquid chromatography determination of Ochratoxin A in artificially contaminated cocoa beans using automated clean-up. *Journal of Chromatography A* 810: 89-94.
- IARC, 1993. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. IARC monographs on the Evaluation

of Carcinogenic Risks to humans. International Agency for Research on Cancer 56: 489-521.

- Iavicoli, I., Brera, C., Carelli, G., Caputi, R., Marinaccio, A. and Miraglia, M., 2002. External and internal dose in subjects occupationally exposed to ochratoxin A. International Archive Occupationally Environment Health 75: 381-386.
- Ibekwe, A.M., Papiernik, S.K., Gan, J., Yates, S.R., Yang, C.H. and Crowley, D.E., 2001. Impact of fumigants on soil microbial communities. Applied and Environmental Microbiology 67: 3245-3257.
- Jalili, M., Jinap, S. and Noranizan, A., 2010. Effect of gamma radiation on reduction of mycotoxins in black pepper. Food Control 21: 1388-1393.
- Jalili, M., Jinap, S. and Son, R., 2011. The effect of chemical treatment on reduction of aflatoxins and ochratoxin A in black and white pepper during washing. Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment 28: 485-493.
- Jard, G., Liboz, T., Mathieu, F., Guyonvarc'h, A. and Lebrihi, A., 2011. Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation. Food Additives and Contaminants Part A Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment 28: 1590-1609.
- Jiménez, A.M., Lopez de Cerain, A., González-penas, E., Bello, J., 1999. A highperformance liquid chromatographic method for the determination of ochratoxin A in human plasma. Chromatographia, 50: 457-469.
- Jorgensen, K., 1998. Survey of pork, poultry, coffee, beer and pulses for Ochratoxin A. Food Additives and Contaminants 15: 550–554.
- Jorgensen, K. and Jacobsen, J.S., 2002. Occurrence of ochratoxin A in Danish wheat and rye, 1992-99. Food additives and contaminants 19: 1184-1189.
- Kaniou-Grigoriadou, I., Eleftheriadou, A., Mouratidou, T., Katikou, P., 2005. Determination of aflatoxin M1 in ewe's milk samples and the produced curd and Feta cheese. Food control, 16: 257-261.
- Kapetanakou, A.E., Kollias, J.N., Drosinos, E.H. and Skandamis, P.N., 2012. Inhibition of *A. carbonarius* growth and reduction of ochratoxin A by bacteria and yeast composites of technological importance in culture media and beverages. International Journal of Food Microbiology 152: 91-99.

- Kappeler, A. W., Baumann, T. W., Greutert, H., 1987. Complexation of purine alkaloids in the coffee plant. In 12^e colloque ASIC. Montreux, Suisse. 247–253.
- Karaca, H., Velioglu, Y.S. and Nas, S., 2010. Mycotoxins: contamination of dried fruits and degradation by ozone. *Toxin Reviews* 29: 51-59.
- Karakousis, A., Tan, L., Ellis, D., Alexiou, H. and Wormald, P.J., 2006. An assessment of the efficiency of fungal DNA extraction methods for maximizing the detection of medically important fungi using PCR. *J Microbiol Methods* 65: 38-48.
- Kevei, F., Hamari, Z., Varga, J., Kozakiewicz, Z. and Croft, J.H., 1996. Molecular polymorphism and phenotypic variation in *Aspergillus carbonarius*. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology* 70: 59-66.
- Khalesi, M et Khatib, N, 2011. The effects of different ecophysiological factors on ochratoxin A production, *Environmental Toxicology and Pharmacology* 32 (2), 113-121
- Kokkonen, M., Jestoi, M., Rizzo, A., 2005. The effect of substrate on mycotoxin production of selected *Penicillium* strains. *International Journal of Food Microbiology*, 99: 207-214.
- Kowalchuk, G.A., Stephen, J.R., DeBoer, W., Prosser, J.I., Embley, T.M. and Woldendorp, J.W., 1997. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria of the beta subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. *Applied and Environmental Microbiology* 63: 1489-1497.
- Kroeplien, U., 1974. Monosaccharides in roasted and instant coffees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 22: 110-116.
- Kuiper-Goodman T; Scott P M 1989. Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomedical and environmental sciences: BES* 2 Issue: 3 179-248.
- Kumar, N.S., Hewavitharanage, P. and Adikaram, N.K.B., 1995. Attack on Tea by *Xyleborus-Fornicatus* - Inhibition of the Symbiote, *Monacrosporium-Ambrosium*, by Caffeine. *Phytochemistry* 40: 1113-1116.
- Kumar, A., Jindal, N., Shukla, C.L., Asrani, R.K., Ledoux, D.R. and Rottinghaus, G.E., 2004. Pathological changes in broiler chickens fed ochratoxin A and inoculated with *Escherichia coli*. *Avian Pathology* 33: 413-417.

- Kurtbay HM, Bekci Z, Merdivan M, Yurdakoc K. 2008. Reduction of ochratoxin A levels in red wine by bentonite, modified bentonites, and chitosan. *J Agric Food Chem.* 56(7):2541–2545.
- Lacey, J. 1986. Factors affecting mycotoxin production. In: *Mycotoxins and phycotoxins* (edited by Steyn, P.S. and Vleggaar, R.), 6th International IUPAC symposium on mycotoxins and phycotoxins, Pretoria, South Africa
- Laforgue, R., Guerin, L., Pernelle, J.J., Monnet, C., Dupont, J. and Bouix, M., 2009. Evaluation of PCR-DGGE methodology to monitor fungal communities on grapes. *Journal of Applied Microbiology* 107: 1208-1218.
- Langseth, W, Hoie, R, Gullord, M., 1995. The influence of cultivars, location and climate on deoxynivalenol contamination in norwegian oats 1985-1990. *ACTA Agriculturae Scandinavica Section B-Soil and Plant Science* 45 Issue: 1 Pages: 63-67
- Le Nguyen, D. D., 2008. Détermination de l'origine géographique des poissons par l'obtention de l'empreinte génétique de leur communauté bactérienne par PCR-DGGE. Thèse de doctorat. Université Montpellier 2, France, 233 p.
- Lebaron, P., Servais, P., Troussellier, M., Courties, C., Vives-Rego, J., Muyzer, G., Bernard, L., Guindulain, T., Schafer, H. and Stackebrandt, E., 1999. Changes in bacterial community structure in seawater mesocosms differing in their nutrient status. *Aquatic Microbial Ecology* 19: 255-267.
- Le-Bars, J., 1988. Toxinogénèse en fonction des conditions écologiques du système grains/microorganismes, dans *Conservation et Stockage des grains et graines, et produits dérivés*. Multon J.L., Editor, Technique et Documentation Lavoisier : Paris, France, pp. 376 – 391.
- Lee, H.B. and Magan, N., 1999. Environmental factors and nutritional utilization patterns affect niche overlap indices between *Aspergillus ochraceus* and other spoilage fungi. *Letters in Applied Microbiology* 28: 300-304.
- Leesing, R. ,2005. Identification et validation de marqueurs spécifiques pour la traçabilité de poisons d'aquaculture lors de leur import/export. Thèse de doctorat. Université Montpellier 2, France, 183 p.
- Leong, S.L., Hien, L.T., An, T.V., Trang, N.T., Hocking, A.D. and Scott, E.S., 2007. Ochratoxin A-producing *Aspergilli* in Vietnamese green coffee beans. *Letters in Applied Microbiology* 45: 301-306.

- Levi, C.P., Trenk, H.L. and Mohr, H.K., 1974. Study of the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans. *J Assoc Off Anal Chem* 57: 866-870.
- Levi, C., 1980. Myco-Toxins in Coffee. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists* 63: 1282-1285.
- Li, X.Y., Zhang, H.W., Wu, M.N., Zhang, Y. and Zhang, C.G., 2008. Effect of methamidophos on soil fungi community in microcosms by plate count, DGGE and clone library analysis. *Journal of Environmental Sciences-China* 20: 619-625.
- Lipps, PE et Deep, IW, 1991. Influence of tillage and crop-rotation on yield, stalk rot, and recovery of *fusarium* and *trichoderma* spp from corn. *Plant Disease* 75: 828-833
- Lombaert, G.A., Pellaers, P., Chettiar, M., Lavalee, D., Scott, P.M. and Lau, B.P.Y., 2002. Survey of Canadian retail coffees for ochratoxin A. *Food additives and contaminants* 19: 869-877.
- Lombaert, G.A., Pellaers, P., Neumann, G., Kitchen, D., Huzel, V., Trelka, R., Kotello, S. and Scott, P.M., 2004. Ochratoxin A in dried vine fruits on the Canadian retail market. *Food additives and contaminants* 21: 578-585.
- Lopez, M.M., Freitas, G., Boiron, P., 2000. Potential utility of random amplified polymorphic DNA (RAPD) and restriction endonuclease assay (REA) as typing systems for *Madurella mycetomatis*. *Current Microbiology*, 40 (1): 1 – 5.
- Lopez-Archilla, A.I., Marin, I. and Amils, R., 2001. Microbial community composition and ecology of an acidic aquatic environment: The Tinto River, Spain. *Microbial Ecology* 41: 20-35.
- MacDonald, S., Wilson, P., Barnes, K., Damant, A., Massey, R., Mortby, E. and Shepherd, M.J., 1999. Ochratoxin A in dried vine fruit: method development and survey. *Food Additives and Contaminants* 16: 253-260.
- Macheix, J.-J., Fleuriet, A., Billot, J., 1990. Changes and metabolism of phenolic compounds in fruits. *Fruit Phenolics*. CRC press. 149-237.
- MAFF, 1999. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. *1998 Survey of retail products for ochratoxin A*. Food surveillance information sheet no. 185. London: Joint Food Safety and Standards Group
- Magan, N., Hope, R., Cairns, V., Aldred, D. 2003. Post-harvest fungal ecology: Impact of fungal growth and mycotoxin accumulation in stored grain. *European Journal of Plant Pathology*, 109 (7), 723-730.

- Magan, N. and Aldred, D., 2007. Post-harvest strategies: minimizing mycotoxins in the food chain. *International Journal of Food Microbiology* 119: 131-139.
- Majerus, P., Bresch, H. and Otteneder, H., 2000. Ochratoxin A in wines, fruit juices and seasonings. *Archiv Fur Lebensmittelhygiene* 51: 95-97.
- Mally, A , Zepnik, H , Wanek, P , Eder, E , Dingley, K , Ihmels, H , Vokel, W , Dekant, W , 2004. Ochratoxin A: Lack of formation of covalent DNA adducts. *Chemical Research in Toxicology* 17 Issue: 2, 234-242.
- Mantle, P.G. and Chow, A.M., 2000. Ochratoxin formation in *Aspergillus ochraceus* with particular reference to spoilage of coffee. *International Journal of Food Microbiology* 56: 105-109.
- Marin, S., Sanchis, V., Rull, F., Ramos, A.J., Magan, N. 1998. Colonization of maize grain by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* in the presence of competing fungi and their impact on fumonisin production. *Journal of Food Protection*, 61 (11), 1489-1496.
- Markaki, P., Delpont-Binet, C., Grosso, F. and Dragacci, S., 2001. Determination of ochratoxin A in red wine and vinegar by immunoaffinity high-pressure liquid chromatography. *Journal of Food Protection* 64: 533-537.
- Markovic, B. 1985. Néphropathie des Balkans et carcinomes à cellules transitionnelles. *Journal Urologie*, 91: 215-220.
- Marsh, T.L., Liu, W.T., Forney, L.J. and Cheng, H., 1998. Beginning a molecular analysis of the eukaryal community in activated sludge. *Water Science and Technology* 37: 455-460.
- Marshall, M.N., Cocolin, L., Mills, D.A. and VanderGheynst, J.S., 2003. Evaluation of PCR primers for denaturing gradient gel electrophoresis analysis of fungal communities in compost. *Journal of Applied Microbiology* 95: 934-948.
- Martinez, C., Baccou, J.C., Delpech, L., Delrieu, M. and Cassan, H., 2002. Procédé de lutte contre des agents pathogènes de plantes agronomiquement utiles à l'aide d'un nouvel éliciteur. Patent n° PCT/FR02/02056.
- Martins, M.L., Martins, H.M. and Gimeno, A., 2003. Incidence of microflora and of ochratoxin A in green coffee beans (*Coffea arabica*). *Food Additives and Contaminants* 20: 1127-1131.

- Masoud, W., Cesar, L.B., Jespersen, L. and Jakobsen, M., 2004. Yeast involved in fermentation of *Coffea arabica* in East Africa determined by genotyping and by direct denaturing gradient gel electrophoresis. *Yeast* 21: 549-556.
- Masoud, W. and Kaltoft, C.H., 2006. The effects of yeasts involved in the fermentation of *Coffea arabica* in East Africa on growth and ochratoxin A (OTA) production by *Aspergillus ochraceus*. *International Journal of Food Microbiology* 106: 229-234.
- Mateo, E.M., Medina, A., Mateo, F., Algarra, F.M.V., Mateo, R. and Jimenez, M., 2009. Lactic acid bacteria: a potential tool to reduce ochratoxin A in wine. In: MendezVilas, A. (ed.) *Proceedings of the 2nd International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology*. Nov 28-Dec 01, 2007. Seville, Spain, pp. 656-659.
- Medina, A., Magan, N. 2011. Temperature and water activity effects on production of T-2 and HT-2 by *Fusarium langsethiae* strains from north European countries, *Food Microbiology*, 28 (3), 392-398.
- Menchu, E. and Rolz, J.F., 1973. Coffee fermentation technology. *Café Cacao* The 17:53-61.
- Meroth, C.B., Hammes, W.P. and Hertel, C., 2003. Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 7453-7461.
- Micco, C., Miraglia, M., Onori, R., Ioppolo, A. and Mantovani, A., 1987. Long-term administration of low doses of mycotoxins in poultry. 1. Residues of ochratoxin A in broilers and laying hens. *Poult Sci* 66: 47-50.
- Micco, C., Miraglia, M., Brera, C., Corneli, S. and Ambruzzi, A., 1995. Evaluation of ochratoxin A level in human milk in Italy. *Food Additives and Contaminants* 12: 351-354.
- Micco, C; Ambruzzi, M A; Miraglia, M; Brera, C; Onori, R; Benelli, L, 1991. Contamination of human milk with ochratoxin A. *IARC scientific publications* Issue: 115 Pages: 105-8
- Mills, D.A., Johannsen, E.A. and Cocolin, L., 2002. Yeast diversity and persistence in botrytis-affected wine fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 4884-4893.

- Miraglia, M; de Dominicis, A; Brera, C; Corneli, S; Cava, E; Menghetti, E; Miraglia, E, 1995. Ochratoxin A levels in human milk and related food samples: an exposure assessment. *Natural toxins* Volume: 3 Issue: 6 Pages: 436-44
- Miraglia, M. and Brera, C., 2002. Assessment of dietary intake of ochratoxin A by the population of EU member states, Reports on tasks for scientific cooperation, task 3.2.7, 69-86. Publisher: SCOOP Directorate-General Health and Consumer Protection.
- Mitchell, D., Parra, R., Aldred, D., Magan N. 2004. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. *J. Appl. Microbiol.*, 97, 439–445
- Molinié, A., Faucet, V., Castegnaro, M. and Pfohl-Leszkowicz, A., 2005. Analysis of some breakfast cereals on the French market for their contents of ochratoxin A, citrinin and fumonisin B1: development of a method for simultaneous extraction of ochratoxin A and citrinin. *Food Chemistry* 92: 391-400.
- Molnar, O., Schatzmayr, G., Fuchs, E. and Prillinger, H., 2004. *Trichosporon mycotoxinivorans* sp nov., a new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins. *Systematic and Applied Microbiology* 27: 661-671.
- Morello, L.G., Sartori, D., Martinez, A.L.D., Vieira, M.L.C., Taniwaki, M.H. and Fungaro, M.H.P., 2007. Detection and quantification of *Aspergillus westerdijkiae* in coffee beans based on selective amplification of beta-tubulin gene by using real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology* 119: 270-276.
- Morishita, H., Iwahashi, H., Kido, R., 1989. 3-O-caffeoyl-4-Oferuloylquinic acid from green Robusta coffee beans. *Phytochemistry* 25: 2679–2680.
- Moss, MO, Frank, JM, 1985. Influence of the fungicide tridemorph on t-2 toxin production by fusarium-sporotrichioides. *Transactions of The British Mycological Society* 84 Pages: 585-590
- Mounjouenpou, P., Durand, N., Guyot, B. and Guiraud, J.P., 2007. Effect of operating conditions on ochratoxin A extraction from roasted coffee. *Food additives and contaminants* 24: 730-734.
- Mounjouenpou, P., Gueule, D., Guyot, B., Tondje, P.R., Fontana-Tachon, A. and Guiraud, J.P., 2008. Filamentous fungi producing ochratoxin A during cocoa processing in Cameroon, *International Journal of Food Microbiology* 121: 234-241.

- Muller, G., Kielstein, P., Kohler, H., Berndt, A. and Rosner, H., 1995. Studies of the influence of ochratoxin A on immune and defense reactions in the mouse model. *Mycoses* 38: 85-91.
- Muller, G., Kielstein, P., Rosner, H., Berndt, A., Heller, M. and Kohler, H., 1999. Studies of the influence of ochratoxin A on immune and defence reactions in weaners. *Mycoses* 42: 495-505.
- Muller, G., Rosner, H., Rohrmann, B., Erler, W., Geschwend, G., Grafe, U., Burkert, B., Moller, U., Diller, R., Sachse, K. and Kohler, H., 2003. Effects of the mycotoxin ochratoxin A and some of its metabolites on the human cell line THP-1. *Toxicology* 184: 69-82.
- Muyzer, G., de Waal, E.C. and Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59: 695-700.
- Myers, R.M., Fischer, S.G., Lerman, L.S. and Maniatis, T., 1985. Nearly All Single Base Substitutions in DNA Fragments Joined to a Gc-Clamp Can Be Detected by Denaturing Gradient Gel-Electrophoresis. *Nucleic Acids Research* 13: 3131-3145.
- Nakajima, M., Tsubouchi, H., Miyabe, M. and Ueno, Y., 1997. Survey of aflatoxin B-1 and ochratoxin A in commercial green coffee beans by high-performance liquid chromatography linked with immunoaffinity chromatography. *Food and Agricultural Immunology* 9: 77-83.
- Nicholson, P, Chandler, E, Draeger, RC, Gosman, NE, Simpson, DR, Thomsett, M, Wilson, AH, 2003. Molecular tools to study epidemiology and toxicology of fusarium head blight of cereals. *European Journal of Plant Pathology*, 109: 691-703 .
- Nieguitsila, A., Deville, M., Jamal, T., Halos, L., Berthelemy, M., Chermette, R., Latouche, S., Arne, P. and Guillot, J., 2007. Evaluation of fungal aerosols using Temporal Temperature Gradient Electrophoresis (TTGE) and comparison with culture. *Journal of Microbiological Methods* 70: 86-95.
- Nielsen, D.S., Honholt, S., Tano-Debrah, K. and Jespersen, L., 2005. Yeast populations associated with Ghanaian cocoa fermentations analysed using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Yeast* 22: 271-284.
- Nikolov, I.G., Petkova-Bocharova, D., Castegnaro, M., Pfohl-Leskowicz, A., Gill, C., Day, N. and Chernozemsky, I.N., 1996. Molecular and epidemiological approaches

to the etiology of urinary tract tumors in an area with Balkan endemic nephropathy. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 15: 201-207.

- Nip, W.K., Chang, F.C., Chu, F.S. and Prentice, N., 1975. Fate of ochratoxin A in brewing. *Appl Microbiol* 30: 1048-1049.
- Noonim, P., Mahakarnchanakul, W., Nielsen, K.F., Frisvad, J.C. and Samson, R.A., 2008. Isolation, identification and toxigenic potential of ochratoxin A-producing *Aspergillus* species from coffee beans grown in two regions of Thailand. *International Journal of Food Microbiology* 128: 197-202.
- Ntougias, S., Kavroulakis, N., Papadopoulou, K.K., Ehalotis, C. and Zervakis, G.I., 2010. Characterization of cultivated fungi isolated from grape marc wastes through the use of amplified rDNA restriction analysis and sequencing. *Journal of Microbiology* 48: 297-306.
- Nunez, Y.P., Pueyo, E., Carrascosa, A.V. and Martinez-Rodriguez, A.J., 2008. Effects of aging and heat treatment on whole yeast cells and yeast cell walls and on adsorption of ochratoxin a in a wine model system. *Journal of Food Protection* 71: 1496-1499.
- O'Callaghan, J., Caddick, M.X. and Dobson, D.W., 2003. A polyketide synthase gene required for Ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus*. *Microbiology* 149: 3485-3491
- O'Callaghan, J., Stapleton, P.C. and Dobson, A.D.W., 2006. Ochratoxin A biosynthetic genes in *Aspergillus ochraceus* are differentially regulated by pH and nutritional stimuli. *Fungal Genetics and Biology* 43: 213-221.
- Obrecht-Pflumio, S., Grosse, Y., Pfohl-Leszkowicz, A. and Dirheimer, G., 1996. Protection by indomethacin and aspirin against genotoxicity of ochratoxin A, particularly in the urinary bladder and kidney. *Archives of Toxicology* 70: 244-248.
- Odhav, B. and Naicker, V., 2002. Mycotoxins in South African traditionally brewed beers. *Food additives and contaminants* 19: 55-61.
- Olive, D.M. and Bean, P., 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. *Journal of Clinical Microbiology* 37: 1661-1669.
- OMS, 1990. Selected mycotoxins: ochratoxins, trichothecenes, ergot. *International Programme on Chemical Safety, Environmental Health Criteria*, 105 p.

- Ottener, H. and Majerus, P., 2001. Ochratoxin A (OTA) in coffee: nation-wide evaluation of data collected by German Food Control 1995-1999. Food additives and contaminants 18: 431-435.
- Ouguerram, A., 1989. Formation and Digestion of the Storage Cell-Wall at Mannan of Coffee (*Coffea-Arabica L*). Annales Des Sciences Naturelles-Botanique Et Biologie Vegetale 10: 111-133.
- Oviedo, MS; Ramirez, ML; Barros, GG; Chulze, SN, 2011. Influence of water activity and temperature on growth and mycotoxin production by *Alternaria alternata* on irradiated soya beans, International Journal of Food Microbiology, 149 (2), 127-132.
- Pardo, A., Marin, S., Sanchis, V., Ramos, A.J., Sanchis, V, 2005a. Effect of water activity and temperature on mycelial growth and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus ochraceus* on irradiated green coffee beans. Journal of Food Protection, 68 (1), 133-138.
- Pardo, A., Marin, S., Sanchis, V., Ramos, A.J., 2005b. Impact of relative humidity and temperature on visible fungal growth and OTA production of ochratoxigenic *A. ochraceus* isolates on grapes. Food microbiology, 22: 383-389.
- Pare, P.W., Farag, M.A., Krishnamachari, V., Zhang, H.M., Ryu, C.M. and Kloepper, J.W., 2005. Elicitors and priming agents initiate plant defense responses. Photosynthesis Research 85: 149-159.
- Parenicova, L., Skouboe, P., Frisvad, J., Samson, R.A., Rossen, L., ten Hoor-Suykerbuyk, M. and Visser, J., 2001. Combined molecular and biochemical approach identifies *Aspergillus japonicus* and *Aspergillus aculeatus* as two species. Applied and Environmental Microbiology 67: 521-527.
- Park, J.W., Kim, E.K., Shon, D.H. and Kim, Y.B., 2002. Natural co-occurrence of aflatoxin B-1, fumonisin B-1 and ochratoxin A in barley and corn foods from Korea. Food additives and contaminants 19: 1073-1080.
- Patharajan, S., Reddy, K.R.N., Karthikeyan, V., Spadaro, D., Lore, A., Gullino, M.L. and Garibaldi, A., 2011. Potential of yeast antagonists on *in vitro* biodegradation of ochratoxin A. Food Control 22: 290-296.
- Paulino De Moraes, M.H. and Luchese, R.H., 2003. Ochratoxin A on green coffee: influence of harvest and drying processing procedures. J Agric Food Chem 51: 5824-5828.

- Pederson, S. and Breed S., 1945. Fermentation of coffee. *Journal of Food Science* Volume 11: 99–106.
- Perez De Obanos, A., Gonzalez-Penas, E. and Lopez De Cerain, A., 2005. Influence of roasting and brew preparation on the ochratoxin A content in coffee infusion. *Food Additives and Contaminants* 22: 463-471.
- Perrone, G., Susca, A., Stea, G. and Mule, G., 2004. PCR assay for identification of *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus japonicus*. *European Journal of Plant Pathology* 110: 641-649.
- Perrone, G., Mule, G., Susca, A., Battilani, P., Pietri, A. and Logrieco, A., 2006a. Ochratoxin A production and amplified fragment length polymorphism analysis of *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus tubingensis*, and *Aspergillus niger* strains isolated from grapes in Italy. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 680-685.
- Perrone, G., Susca, A., Epifani, F. and Mule, G., 2006b. AFLP characterization of southern Europe population of *Aspergillus* section *Nigri* from grapes. *International Journal of Food Microbiology* 111: S22-S27.
- Petchkongkaew, A., Taillandier, P., Gasaluck, P. and Lebrihi, A., 2008. Isolation of *Bacillus spp.* from Thai fermented soybean (Thua-nao): screening for aflatoxin B-1 and ochratoxin A detoxification. *Journal of Applied Microbiology* 104: 1495-1502.
- Péteri, Z., Téren, J., Vágvölgyi, C. and Varga, J., 2007. Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. *Food Microbiology* 24: 205–210.
- Petkova-Bocharova, T., Stoichev, Il, Chernozemsky, I.N., Castegnaro, M. and Pfohl-Leszkowicz, A., 1998. Formation of DNA adducts in tissues of mouse progeny through transplacental contamination and/or lactation after administration of a single dose of ochratoxin A to the pregnant mother. *Environ Mol Mutagen* 32: 155-162.
- Petraco, N. and Kubic, T., 2000. Density gradient technique for use in forensic soil analysis. *Journal of Forensic Sciences* 45: 872-873.
- Petzinger, E. and Ziegler, K., 2000. Ochratoxin A from a toxicological perspective. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 23: 91-98.
- Petzinger, E. and Weidenbach, A., 2002. Mycotoxins in the food chain: the role of ochratoxins. *Livestock Production Science* 76: 245-250.

- Pfohl-Leszkowicz, A; Chakor, K; Creppy, E E; Dirheimer, G, 1991. DNA adduct formation in mice treated with ochratoxin A. IARC scientific publications Issue: 115 Pages: 245-53
- Pfohl-Leszkowicz A. and Castegnaro M. 1999. L'ochratoxine A. In : Pfohl-Leszkowicz A. (ed.), Les Mycotoxines dans l'alimentation: évolution et gestion des risques. Lavoisier, Paris, France, pp. 249-277.
- Pfohl-Leszkowicz, A. and Manderville, R.A., 2007. Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans. Molecular Nutrition & Food Research 51: 61-99.
- Pfohl-Leszkowicz, A., 2009. Ochratoxin A and aristolochic acid involvement in nephropathies and associated urothelial tract tumours. Arh Hig Rada Toksikol 60: 465-483.
- Pietri, A., Bertuzzi, T., Pallaroni, L. and Piva, G., 2001. Occurrence of ochratoxin A in Italian wines. Food additives and contaminants 18: 647-654.
- Pintado, J., Guyot, J.P. and Ampe, F., 2003. Multiple competitive PCR-DGGE as a tool for quantifying and profiling defined mixed cultures of lactic acid bacteria during production of probiotics from complex polysaccharides. Journal of Applied Microbiology 95: 921-933.
- Pirgozliev, SR, Edwards, SG, Hare, MC, Jenkinson, P, 2003. Strategies for the control of *Fusarium* head blight in cereals. European Journal of Plant Pathology 109 Issue: 7 Pages: 731-742.
- Pitt, J.I., Hocking, A.D., 1997. Fungi and food spoilage. In: Blackie Academic and Professional, London
- Pitt, J.I., Basilico, J.C., Abarca, M.L. and Lopez C., 2000. Mycotoxins and toxinogenic fungi. Medical Mycology 38: 41-46.
- Pitt J. I. 2001, The importance of Ochratoxin A in Foods: Report on the 56th Meeting of JECFA. In 19th ASIC Coffee Conference, Trieste, Italy. 14-18 May..
- Pittet, A., Tornare, D., Huggett, A. and Viani, R., 1996. Liquid chromatographic determination of ochratoxin A in pure and adulterated soluble coffee using an immunoaffinity column cleanup procedure. Journal of Agricultural and Food Chemistry 44: 3564-3569.

- Ponsone, M.L., Chiotta, M.L., Combina, M., Dalcero, A. and Chulze, S., 2011. Biocontrol as a strategy to reduce the impact of ochratoxin A and *Aspergillus* section *Nigri* in grapes. *International Journal of Food Microbiology* 151: 70-77.
- Prakitchaiwattana, C.J., Fleet, G.H. and Heard, G.M., 2004. Application and evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis to analyse the yeast ecology of wine grapes. *Fems Yeast Research* 4: 865-877.
- Puerta –Quintero, G.I., 1999. Influencia del Proceso de Beneficio en la Calidad del Café. *Cenicafé*, 50: 78–88
- Ramos A. J., Labernia N., Marín S., Sanchis V. & Magan N., 1998, Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of *Aspergillus ochraceus* on a barley extract medium and on barley grains. *International Journal of Food Microbiology*, 44: 133-140.
- Ramos, D.M.B., Silva, C.F., Batista, L.R. and Schwan, R.F., 2010. *In vitro* inhibition of toxigenic filamentous fungi. *Acta Scientiarum. Agronomy* 32: 397-402.
- Ratola, N., Abade, E., Simoes, T., Venâncio, A., & Alves, A., 2005. Evolution of ochratoxin A content from must to wine in Port Wine microvinification. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 382: 405–409.
- Reboux, G, 2006. Mycotoxins: health effects and relationship to other organic compounds. *Revue Francaise d'Allergologie et d'Immunologie Clinique*, 46 : 208-212.
- Refai, M.K., Aziz, N.H., ElFar, F. and Hassan, A.A., 1996. Detection of ochratoxin produced by *A-ochraceus* in feedstuffs and its control by gamma radiation. *Applied Radiation and Isotopes* 47: 617-621.
- Reverberi M., Punelli F., Scarpari M., Camera E., Zjalic S., Ricelli A., Fanelli C. and Fabbri A.A. 2010. Lipoperoxidation affects ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus ochraceus* and its interaction with wheat seeds. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85: 1935-1946.
- Reysenbach, A.L., Giver, L.J., Wickham, G.S. and Pace, N.R., 1992. Differential Amplification of Ribosomal-Rna Genes by Polymerase Chain-Reaction. *Applied and Environmental Microbiology* 58: 3417-3418.
- Ringot, D., Lerzy, B., Bonhoure, J.P., Auclair, E., Oriol, E. and Larondelle, Y., 2005. Effect of temperature on *in vitro* ochratoxin A biosorption onto yeast cell wall derivatives. *Process Biochemistry* 40: 3008-3016.

- Ringot, D., Chango, A., Scheneider, Y.J., Larondelle, Y., 2006. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chemico-Biological Interactions*, 159: 18-46.
- Rodriguez, H., Reveron, I., Doria, F., Costantini, A., De las Rivas, B., Munoz, R. and Garcia-Moruno, E., 2011. Degradation of Ochratoxin A by *Brevibacterium* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 10755-10760.
- Romani, S., Sacchetti, G., Lopez, C.C., Pinnavaia, G.G. and Dalla Rosa, M., 2000. Screening on the occurrence of ochratoxin A in green coffee beans of different origins and types. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 3616-3619.
- Romani, S., Pinnavaia, G.G. and Dalla Rosa, M., 2003. Influence of roasting levels on ochratoxin A content in coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51: 5168-5171.
- Rosa, C.A.R., Magnoli, C.E., Fraga, M.E., Dalcero, A.M. and Santana, D.M.N., 2004. Occurrence of ochratoxin A in wine and grape juice marketed in Rio de Janeiro, Brazil. *Food additives and contaminants* 21: 358-364.
- Ros-Chumillas, M., Egea-Cortines, M., Lopez-Gomez, A. and Weiss, J., 2007. Evaluation of a rapid DNA extraction method to detect yeast cells by PCR in orange juice. *Food Control* 18: 33-39.
- Roussos, S., Aquiahuatl, M.D., Trejohernandez, M.D., Perraud, I.G., Favela, E., Ramakrishna, M., Raimbault, M. and Viniegragonzalez, G., 1995. Biotechnological Management of Coffee Pulp - Isolation, Screening Characterization, Selection of Caffeine Degrading Fungi and Natural Microflora Present in Coffee Pulp and Husk. *Applied Microbiology and Biotechnology* 42: 756-762.
- Saad, D.S., Kinsey, G.C., Kim, S. and Gaylarde, C.C., 2004. Extraction of genomic DNA from filamentous fungi in biofilms on water-based paint coatings. *International Biodeterioration & Biodegradation* 54: 99-103.
- Samson, R.A., 1991. Identification of food-borne *Penicillium*, *Aspergillus* and *Fusarium* species. In *ACIAR proceedings No 36*, Bangkok, Thailand, 23-26 April pp. 39-45.
- Samson, R.A.; Hoekstra, E.S.; Frisvad, J.C., 2004. *Introduction to Food and Airborne Fungi*, 7th ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures: Utrecht, The Netherlands.

- Samson, R.A., Hong, S.B. and Frisvad, J.C., 2006. Old and new concepts of species differentiation in *Aspergillus*. *Medical Mycology* 44: S133-S148.
- Samson, R.A., Noonim, P., Meijer, M., Houbraeken, J., Frisvad, J.C. and Varga, J., 2007. Diagnostic tools to identify black *aspergilli*. *Studies in Mycology*: 129-145.
- Sangare-Tigori, B., Moukha, S., Kouadio, J.H., Dano, D.S., Betbeder, A.M., Achour, A. and Creppy, E.E., 2006. Ochratoxin A in human blood in Abidjan, Côte d'Ivoire. *Toxicon* 47: 894-900.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R., 1977. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 5463-5467.
- Sartori, D., Furlaneto, M.C., Martins, M.K., Ferreira de Paula, M.R., Pizzirani-Kleiner, A.A., Taniwaki, M.H. and Fungaro, M.H., 2006. PCR method for the detection of potential ochratoxin-producing *Aspergillus* species in coffee beans. *Research in Microbiology* 157: 350-354.
- Schäfer, H., & Muyzer, G., 2001. Denaturing gradient gel electrophoresis in marine microbial ecology. *Methods in Microbiology* 30: 425-452.
- Schatzmayr, G.; Heidler, D.; Fuchs, E.; Mohnl, M.; Täubel, M.; Loibner, A.P.; Braun, R.; Binder, E.M. 2003 Investigation of different yeast strains for the detoxification of ochratoxin A. *Mycot. Res.*, 19, 124–128.
- Schatzmayr, G., Schatzmayr, D., Pichler, E., Taubel, M., Loibner, A.R. and Binder, E.M., 2006. A novel approach to deactivate ochratoxin A. In: Njapau, H., Trujillo, S., Van Egmond, H.P. and Park, DL (eds) *Proceedings of the 11th International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins*. May 17-21, 2004. Bethesda, MD, USA, pp. 279-288.
- Schmidt, H., Taniwaki, M.H., Vogel, R.F. and Niessen, L., 2004. Utilization of AFLP markers for PCR-based identification of *Aspergillus carbonarius* and indication of its presence in green coffee samples. *Journal of Applied Microbiology* 97: 899-909.
- Schmidt-Heydt, Markus; Graf, Eva; Stoll, Dominic; Geisen, Rolf., 2012. The biosynthesis of ochratoxin A by *Penicillium* as one mechanism for adaptation to NaCl rich foods. *Food microbiology* 29: 233-41)
- Schulthess, B.H. and Baumann, T.W., 1995. Are Xanthosine and 7-Methylxanthosine Caffeine Precursors. *Phytochemistry* 39: 1363-1370.

- Scott, P.M., 1994. Mycotoxins in grain. Compounds other than aflatoxins. *Phytopathology*, 2238: 261-507.
- Scott, P.M. and Kanhere, S.R., 1995. Determination of ochratoxin A in Beer. *Food additives and contaminants* 12: 591-598.
- Scudamore, K.A. and Patel, S., 2000. Survey for aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and fumonisins in maize imported into the United Kingdom. *Food additives and contaminants* 17: 407-416.
- Scudamore, K. A., Banks, J., & MacDonald, S. J., 2003. Fate of ochratoxin A in the processing of whole wheat grains during milling and bread production. *Food Additives and Contaminants* 20: 1153–1163.
- Selma, M.V., Martinez-Culebras, P.V. and Aznar, R., 2008. Real-time PCR based procedures for detection and quantification of *Aspergillus carbonarius* in wine grapes. *International Journal of Food Microbiology* 122: 126-134.
- Serra, R., Mendonca, C., Abrunhosa, L., Pietri, A. and Venancio, A., 2004. Determination of ochratoxin A in wine grapes: comparison of extraction procedures and method validation. *Analytica Chimica Acta* 513: 41-47.
- Serra, R., Cabanes, F.J., Perrone, G., Castella, G., Venancio, A., Mule, G. and Kozakiewicz, Z., 2006. *Aspergillus ibericus*: a new species of section *Nigri* isolated from grapes. *Mycologia* 98: 295-306.
- Serratos, M.P., Lopez-Toledano, A., Millan, C., Medina, M. and Merida, J., 2010. Changes of ochratoxin A in grapes inoculated with *Aspergillus carbonarius* and subjected to chamber-drying under controlled conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 11907-11912.
- Sheffield, V.C., Cox, D.R., Lerman, L.S. and Myers, R.M., 1989. Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 232-236.
- Shetty, P.H. and Jespersen, L., 2006. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends in Food Science & Technology* 17: 48-55.
- Silva, C.F., Schwan, R.F., Dias, E.S. and Wheals, A.E., 2000. Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. *International Journal of Food Microbiology* 60: 251-260.

- Silva, C.F., Batista, L.R., Abreu, L.M., Dias, E.S. and Schwan, R.F., 2008a. Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. *Food Microbiology* 25: 951-957.
- Silva, C.F., Batista, L.R. and Schwan, R.F., 2008b. Incidence and distribution of filamentous fungi during fermentation, drying and storage of coffee (*Coffea Arabica* L.) beans. *Brazilian Journal of Microbiology* 39: 521-526.
- Skaug, M.A., Stormer, F.C. and Saugstad, O.D., 1998. Ochratoxin A: a naturally occurring mycotoxin found in human milk samples from Norway. *Acta Paediatr* 87: 1275-1278.
- Skaug MA. 1999. Analysis of Norwegian milk and infant formulas for Ochratoxin A. *Food Addit Contam* 16: 75–8.
- Smit, E., Leeflang, P., Glandorf, B., van Elsas, J.D. and Wernars, K., 1999. Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2614-2621.
- Someren, M.A.K., Harmsen, J.A.M., Kester, H.C.M. and Visser, J., 1991. Structure of the *Aspergillus Niger*-Pela Gene and Its Expression in *AspergillusNiger* and *Aspergillus-Nidulans*. *Current Genetics* 20: 293-299.
- Speer, K., Sehat, N., Montag, A., 1993. Fatty acids in coffee. In: 15th International Colloquium on the Chemistry of Coffee, ASIC. Paris, France: 583-92.
- Stander, M.A., Bornscheuer UT., Henke E., Steyn PS., 2000. Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 48 : 5736-5739.
- Stennert, A. and Maier, H.G., 1994. Trigonelline in Coffee .2. Content of Green, Roasted and Instant Coffee. *Zeitschrift Fur Lebensmittel-Untersuchung Und-Forschung* 199: 198-200.
- Steyn, P.S., 1993. Ochratoxin A: its chemistry, conformation and biosynthesis. *INSERM/John Libbey Eurotext*, 231: 51-58.
- Stoev, S.D., Goundasheva, D., Mirtcheva, T. and Mantle, P.G., 2000. Susceptibility to secondary bacterial infections in growing pigs as an early response in ochratoxicosis. *Exp Toxicol Pathol* 52: 287-296.

- Stoev, S.D., Djuvinov, D., Mirtcheva, T., Pavlov, D. and Mantle, P., 2002. Studies on some feed additives giving partial protection against ochratoxin A toxicity in chicks. *Toxicology Letters* 135: 33-50.
- Studer-Rohr, I., Dietrich, D.R., Schlatter, J., Schlatter, C., 1995. The occurrence of ochratoxin A in coffee. *Food and Chemical Toxicology*, 33: 341–355.
- Studer-Rohr, I., Schlatter, J. and Dietrich, D.R., 2000. Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans. *Archives of Toxicology* 74: 499-510.
- Suárez-Quiroz, M.L., González-Rios, O, Barel, M., Guyot, B., Schorr-Galindo, S., Guiraud, J.P., 2004a. Effect of chemical and environmental factors on *Aspergillus ochraceus* growth and toxigenesis in green coffee. *Food Microbiology*, 21: 629-634.
- Suárez-Quiroz, M., González-Rios, O., Barel, M., Guyot, B., Schorr-Galindo, S. and Guiraud, J.P., 2004b. Study of Ochratoxin A-producing strains in coffee processing. *Journal of Food Science and Technology* 39: 501–507.
- Suárez-Quiroz, M., González-Rios, O., Barel, M., Guyot, B., Schorr-Galindo, S. and Guiraud, J.P., 2005a. Effect of post-harvest processing procedure on OTA occurrence in artificially contaminated coffee. *International Journal of Food Microbiology* 103: 339-345.
- Suárez-Quiroz, M., De Luise, B., González-Rios, O., Barel, M., Guyot, B., Schorr-Galindo, S. and Guiraud, J.P., 2005b. The impact of roasting on the ochratoxin A content of coffee. *International Journal of Food Science and Technology* 40: 605-611
- Susca, A., Stea, G., Mule, G. and Perrone, G., 2007a. Polymerase chain reaction (PCR) identification of *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* based on the calmodulin gene. *Food additives and contaminants* 24: 1154-1160.
- Susca, A., Stea, G. and Perrone, G., 2007b. Rapid polymerase chain reaction (PCR)-single-stranded conformational polymorphism (SSCP) screening method for the identification of *Aspergillus* section *Nigri* species by the detection of calmodulin nucleotide variations. *Food additives and contaminants* 24: 1148-1153.
- Tangni, E.K., Ponchaut, S., Maudoux, M., Rozenberg, R. and Larondelle, Y., 2002. Ochratoxin A in domestic and imported beers in Belgium: occurrence and exposure assessment. *Food additives and contaminants* 19: 1169-1179.

- Taniwaki M. H., Pitt J. I., Teixeira A. A. & Iamanaka B. T., 2003, The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *International Journal of Food Microbiology*, 82 (2): 173-179.
- Tatu, C.A., Drugarin, D., Paunescu, V., Stanescu, D.I. and Schneider, F., 1998. Balkan endemic nephropathy, the haematopoietic system and the environmental connection. *Food and Chemical Toxicology* 36: 245-247.
- Taylor, J.W., Geiser, D.M., Burst, A., Koufopanou, V., 1999. The evolutionary biology and population genetics underlying fungal strain typing. *Clinical Microbiology Reviews*, 12: 126-130.
- Teren, J., Varga, J., Hamari, Z., Rinyu, E., Kevei, F., 1996. Immunochemical detection of Ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia*, 134: 171-176.
- Thirumala-Devi, K., Mayo, M.A., Reddy, G., Tangni, E.K., Larondelle, Y. and Reddy, D.V., 2001. Occurrence of ochratoxin A in black pepper, coriander, ginger and turmeric in India. *Food Additives and Contaminants* 18: 830-835.
- Thompson, J.D., Gibson, T.J. and Higgins, D.G., 2002. Multiple Sequence Alignment Using ClustalW and ClustalX, *Current Protocols in Bioinformatics*. John Wiley & Sons, Inc.
- Tjamos, S.E., Antoniou, P.P., Kazantzidou, A., Antonopoulos, D.F., Papageorgiou, I. and Tjamos, E.C., 2004. *Aspergillus niger* and *Aspergillus carbonarius* in Corinth raisin and wine-producing vineyards in Greece: Population composition, Ochratoxin A production and chemical control. *Journal of Phytopathology* 152: 250-255.
- Trotel-Aziz P., Couderchet M., Vernet G. and Aziz A., 2006. Chitosan defense reactions in grapevine leaves and inhibits development of *Botrytis cinerea*. *European Journal of Plant Pathology* 114: 405-413.
- Tsubouchi H, Yamamoto K, Hisada K, Sakabe. Y., 1984. A survey of occurrence of mycotoxins and toxigenic fungi in imported green coffee beans. *Proc Japan Assoc Mycotoxicol* 19: 14-21.
- Tsubouchi, H., Terada, H., Yamamoto, K., Hisada, K. and Sakabe, Y., 1985. Caffeine degradation and increased ochratoxin A production by toxigenic strains of *Aspergillus ochraceus* isolated from green coffee beans. *Mycopathologia* 90: 181-186.

- Tsubouchi, H., Yamamoto, K., Hisada, K., Sakabe, Y. and Udagawa, S., 1987. Effect of roasting on ochratoxin A level in green coffee beans inoculated with *Aspergillus ochraceus*. *Mycopathologia* 97: 111-115.
- Turesky, R.J., 2005. Perspective: Ochratoxin A is not a genotoxic carcinogen. *Chemical Research in Toxicology* 18: 1082-1090.
- Upadhaya, S.D., Song, J.Y., Park, M.A., Seo, J.K., Yang, L., Lee, C.H., Cho, K.J. and Ha, J.K., 2012. Isolation, Screening and Identification of Swine Gut Microbiota with Ochratoxin A Biodegradation Ability. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 25: 114-121.
- Urbano, G.R., Taniwaki, M.H., Leitao, M.F.D. and Vicentini, M.C., 2001. Occurrence of ochratoxin A-producing fungi in raw Brazilian coffee. *Journal of Food Protection* 64: 1226-1230.
- Vainio, E.J. and Hantula, J., 2000. Direct analysis of wood-inhabiting fungi using denaturing gradient gel electrophoresis of amplified ribosomal DNA. *Mycological Research* 104: 927-936.
- Valenta, H., 1998. Chromatographic methods for determination of ochratoxin A in animal and human tissues and fluids. *Journal of Chromatography*, 815: 75-92.
- Valero, A., Olivan, S., Marin, S., Sanchis, V. and Ramos, A. J., 2007. Effect of intra and interspecific interaction on OTA production by *A. section Nigri* in grapes during dehydration. *Food Microbiology* 24: 254–259.
- Valero, A., Sanchis, V., Ramos, A.J. and Marin, S., 2008. Brief *in vitro* study on *Botrytis cinerea* and *Aspergillus carbonarius* regarding growth and ochratoxin A. *Letters in Applied Microbiology* 47: 327–332.
- Vallaey, T., Topp, E., Muyzer, G., Macheret, V., Laguerre, G., Rigaud, A. and Soulas, G., 1997. Evaluation of denaturing gradient gel electrophoresis in the detection of 16S rDNA sequence variation in *rhizobia* and *methanotrophs*. *Fems Microbiology Ecology* 24: 279-285.
- Van der Stegen, G., Jorissen, U., Pittet, A., Saccon, M., Steiner, W., Vincenzi, M., Winkler, M., Zapp, J. and Schlatter, C., 1997. Screening of European coffee final products for occurrence of ochratoxin A (OTA). *Food Additives and Contaminants* 14: 211-216.
- Van der Stegen, G.H., Essens, P.J. and van der Lijn, J., 2001. Effect of roasting conditions on reduction of ochratoxin a in coffee. *J Agric Food Chem* 49: 4713-4715.

- Van Egmond, H.P., 1999. Worldwide regulation of ochratoxin A. IARC Sci. Publ. 115, 331-336.
- Van Elsas, J.D., Duarte, G.F., Keijzer-Wolters, A. and Smit, E., 2000. Analysis of the dynamics of fungal communities in soil via fungal-specific PCR of soil DNA followed by denaturing gradient gel electrophoresis. Journal of Microbiological Methods 43: 133-151.
- Van Hannen, E.J., Mooij, W.M., van Agterveld, M.P., Gons, H.J. and Laanbroek, H.J., 1999. Detritus-dependent development of the microbial community in an experimental system: Qualitative analysis by denaturing gradient gel electrophoresis. Applied and Environmental Microbiology 65: 2478-2484.
- Van Pee, W., Castelein, J.M., 1972. Study of the pectinolytic microflora, particularly the Enterobacteriaceae, from fermenting coffee in the Congo. Food Sci., 37: 171–174.
- Var, I., Kabak, B. and Erginkaya, Z., 2008. Reduction in ochratoxin A levels in white wine, following treatment with activated carbon and sodium bentonite. Food Control 19: 592-598.
- Varga, J., Kevei, F., Fekete, C., Coenen, A., Kozakiewicz, Z. and Croft, J.H., 1993. Restriction-Fragment-Length-Polymorphisms in the Mitochondrial Dnas of the *Aspergillus Niger* Aggregate. Mycological Research 97: 1207-1212.
- Varga, J., Kevei, F., Vriesema, A., Debets, F., Kozakiewicz, Z. and Croft, J.H., 1994. Mitochondrial-DNA Restriction-Fragment-Length-Polymorphisms in-Field Isolates of the *Aspergillus Niger* Aggregate. Canadian Journal of Microbiology 40: 612-621.
- Varga, J., Kevei, F., Rinyu, F., Téren, J., Kozakiewicz, Z., 1996. Ochratoxin production by *Aspergillus* species. Applied and Environmental Microbiology, 62: 4461-4464.
- Varga, J., Rigo, K., Teren, J., 2000. Degradation of ochratoxin A by *Aspergillus* species. International Journal of Food Microbiology 59: 1-7.
- Varga, J.; Rigó, K.; Kocsubé, S.; Farkas, B.; Pál, K. 2003. Diversity of polyketide synthase gene sequences in *Aspergillus* species. Res. Microbiol., 154, 593–600
- Varga, J., Peteri, Z., Tabori, K., Teren, J. and Vagvolgyi, C., 2005. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. International Journal of Food Microbiology 99: 321-328.

- Varga, J. and Kozakiewicz, Z., 2006. Ochratoxin A in grapes and grape-derived products. *Trends in Food Science & Technology* 17: 72-81.
- Varga, J., Kocsube, S., Toth, B., Frisvad, J.C., Perrone, G., Susca, A., Meijer, M. and Samson, R.A., 2007. *Aspergillus brasiliensis* sp nov., a biseriate black *Aspergillus* species with world-wide distribution. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57: 1925-1932.
- Velmourougane, K., Bhat, R., Gopinandhan, T.N. and Panneerselvam, P., 2011a. Impact of delay in processing on mold development, ochratoxin-A and cup quality in arabica and robusta coffee. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 27: 1809-1816.
- Velmourougane, K., Bhat, R., Gopinandhan, T.N. and Panneerselvam, P., 2011b. Management of *Aspergillus ochraceus* and Ochratoxin-A contamination in coffee during on-farm processing through commercial yeast inoculation. *Biological Control* 57: 215-221
- Verger, P., Garnier-Sagne, I. and Leblanc, J.C., 1999. Identification of risk groups for intake of food chemicals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 30: S103-S108.
- Verger, P., Counil, E., Tressou, J. and Leblanc, J.C., 2005. Some recent advances in modelling dietary exposure to ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants* 22 Suppl 1: 94-98.
- Vilela, D.M., Pereira, G.V.D., Silva, C.F., Batista, L.R. and Schwan, R.F., 2010. Molecular ecology and polyphasic characterization of the microbiota associated with semi-dry processed coffee (*Coffea arabica* L.). *Food Microbiology* 27: 1128-1135.
- Wagacha, J.M. and Muthomi, J.W., 2008. Mycotoxin problem in Africa: Current status, implications to food safety and health and possible management strategies. *International Journal of Food Microbiology* 124: 1-12.
- Waites, M.J., Reynolds, S.B. and Friend, J., 1978. The metabolism of chlorogenic acid in tuber discs of a resistant and a susceptible potato cultivar after inoculation with *Fusarium solani* var. *caeruleum* [proceedings]. *Biochem Soc Trans* 6: 441-442.
- Weidenburner, M., 2001. *Encyclopedia of Food Mycotoxins*. Springer-Berlin (DEU), 296p.

- WHO (World Health Organization) 1996. Evaluation of certain food additives and contaminants. 44th Report of JECFA, WHO Technical Report series 859, WHO, Geneva, Switzerland.
- Wootton, A.E., 1963. The fermentation of coffee. *Kenya Coffee* 28: 239-249.
- Wu, Q., Dohnal, V., Huang, L., Kuca, K., Wang, X., Chen, G. and Yuan, Z., 2011. Metabolic pathways of ochratoxin A. *Curr Drug Metab* 12: 1-10.
- Xiao, H., Madhyastha, S., Marquardt, R.R., Li, S., Vodela, J.K., Frohlich, A.A., Kemppainen, W., 1996. Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: structure-activity relationships. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 137: 182-192.
- Yu, F.G., Zhu, X.C. and Du, L.C., 2005. Developing a genetic system for functional manipulations of FUM1, a polyketide synthase gene for the biosynthesis of fumonisins in *Fusarium verticillioides*. *Fems Microbiology Letters* 248: 257-264.
- Zettler, L.A.A., Gomez, F., Zettler, E., Keenan, B.G., Amils, R. and Sogin, M.L., 2002. Eukaryotic diversity in Spain's River of Fire - This ancient and hostile ecosystem hosts a surprising variety of microbial organisms. *Nature* 417: 137-137.
- Zimmerli, B. and Dick, R., 1995. Determination of ochratoxin A at the ppt level in human blood, serum, milk and some foodstuffs by high-performance liquid chromatography with enhanced fluorescence detection and immunoaffinity column cleanup: methodology and Swiss data. *J Chromatogr B Biomed Appl* 666: 85-99.
- Zinedine, A., Brera, C., Elakhdari, S., Catano, C., Debegnach, F., Angelini, S., De Santis, B., Faid, M., Benlemlih, M., Minardi, V. and Miraglia, M., 2006. Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. *Food Control* 17: 868-874.
- Zuluaga, J.V., Valencia, G.A., Gonzales, J., 1971. Contribucion al estudio de la naturaleza de la resistencia del cafeto a *Ceratocystis fimbriata*. *Cenicafé* 22: 43-70.

Dynamique des populations microbiennes au cours du traitement post récolte du café et relations interspécifiques entre souches ochratoxinogènes

L'ochratoxine A (OTA), principalement produite dans le café par les moisissures *A. ochraceus* et *A. westerdijkiae*, suscite une attention particulière pour ses effets néphrotoxiques, immunotoxiques, tératogènes et cancérogènes. La présence d'OTA dans les grains de café peut être mise en relation avec les conditions de récolte, les conditions de traitement post-récolte et les conditions de stockage et de transport. Dans certains pays producteurs, les dommages causés sur les grains de café par des espèces fongiques sont liés à des teneurs élevées en OTA.

La dynamique et la biodiversité des populations microbiennes (bactéries, levures, moisissures) lors des traitements post-récolte du café a été étudiée par une méthode d'analyse moléculaire globale des flores, la PCR-DGGE. Il a été observé une évolution et une diversité des flores microbiennes en fonction du type et des étapes des traitements utilisés, spécifiques des lieux de production. La région génomique ciblée et la proximité phylogénétique sont un obstacle à l'identification des souches ochratoxinogènes par l'approche globale utilisée. De plus, une méthode simple et rapide de différenciation moléculaire d'*Aspergillus westerdijkiae* et d'*Aspergillus ochraceus* a été mise au point et couplée avec l'analyse d'image pour permettre la « quantification » d'*Aspergillus westerdijkiae*. Des phénomènes de compétition/inhibition de la croissance et production d'OTA (supérieurs à 90%) ont été mis en évidence pour des souches d'*Aspergillus niger* et d'*Aspergillus ochraceus* faiblement productrices d'OTA vis-à-vis d'*Aspergillus westerdijkiae* qui est l'une des espèces les plus fortement productrices de la mycotoxine sur café. Les résultats obtenus au cours de ce travail sont importants pour l'amélioration des connaissances sur la dynamique des populations microbiennes au cours des procédés de transformation du café ainsi que pour de possibles applications en prévention et maîtrise de la contamination du café par l'OTA.

Mots clefs : *Aspergillus*, café, ochratoxine, PCR-DGGE, Ecologie Microbienne, Microbiologie, Biologie Moléculaire, PCR-DGGE

Dynamics of microbial populations during coffee post-harvest treatment and interspecific relations between ochratoxinogenic fungal strains

Ochratoxin A (OTA) is mainly produced on coffee beans by fungal species *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus westerdijkiae*, and is known for its impact on human health through nephrotoxic, immunotox, teratogenic and oncogenic effects. The OTA content in coffee was shown to be closely linked to harvesting conditions, post-harvest processing conditions and especially dry processing, storage and transportation conditions. In some producing countries, damaged caused on beans by fungal communities undoubtedly lead to high OTA contents in coffee. In order to understand the OTA contamination process, the dynamics and biodiversity of microbial populations (bacteria, yeast and moulds) was analyzed during post-harvest treatment by use of a global microbial ecology approach at the molecular level, so-called PCR-DGGE. Specific variations in evolution and diversity of microbial flora were observed as a function of the step and type of treatment, which were specific of the location of production. The genomic region targeted by the global approach and the genetic proximity of ochratoxinogenic fungal strains made their study and identification difficult using the the global approach. In addition, a simple and rapid method for the molecular differentiation of *A. westerdijkiae* and *A. ochraceus* was established and, coupled with image analysis, allowed the quantification of *A. westerdijkiae*.

Moreover, competition and inhibition effects on growth and OTA production (>90%) could be observed for low OTA producers *A. niger* and *A. ochraceus* species towards the high OTA producer *A. westerdijkiae* species.

Results obtained during this study are of importance for understanding microbial population dynamics during coffee transformation processes. Moreover, it provides possible clues for prevention and control of coffee contamination by OTA.

Keywords : *Aspergillus*, coffee, ochratoxin A, Microbial Ecology, Microbiology, Molecular Biology, PCR-DGGE